



**ТРУДЫ  
IV ВСЕСОЮЗНОЙ  
КОНФЕРЕНЦИИ  
ПО БИОХИМИИ  
НЕРВНОЙ  
СИСТЕМЫ**

**ТАРТУ, 1969**

ТАРТУСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ АН УКРАИНСКОЙ ССР

**ТРУДЫ**  
**IV ВСЕСОЮЗНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**  
**ПО БИОХИМИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

ТАРТУ  
19—25 июня 1966 г.

ТАРТУ 1969



ТРУДЫ IV ВСЕСОЮЗНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО БИОХИМИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

На русском языке

Тартуский государственный университет, ЭССР, г. Тарту, ул. Юликооли, 18

Ответственный редактор Л. Я. Тяхепыльд

Корректор Ю. Х. Сарв

---

Сдано в набор 17/III 1969 г. Подписано к печати 30/IX 1969 г. Печ. листов 46,0.  
Учетно-издат. листов 43,2. Бумага фабрики «Кохила», типографская № 2. 60 × 90.  $\frac{1}{16}$ .  
Тираж 800 экз. МВ-00648. Заказ № 1828. Типография им. Ханса Хейдеманна, ЭССР,  
г. Тарту, ул. Юликооли, 17/19. II

---

Цена 4 руб.

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Вопросы биохимии нервной системы, являющейся одной из наиболее важных в теоретическом и практическом отношении проблем биохимии, широко изучаются советскими биохимиками, и число научных учреждений Советского Союза и научных работников, включающихся в их изучение, с каждым годом растет.

Для успешной разработки этой важной и вместе с тем одной из наиболее сложных проблем биохимии необходимо периодически подводить итоги проведенных работ, давать критическую оценку результатов, путей и методов исследования и намечать направления дальнейшей работы.

Первые итоги исследований по биохимии нервной системы, выполненных в Советском Союзе, были подведены на Всесоюзной научной конференции, состоявшейся в декабре 1953 года в Киеве и нашли свое отражение в сборнике «Биохимия нервной системы», изданном в 1954 г.

Вторая научная конференция по биохимии нервной системы состоялась в Киеве в 1957 г. Доклады, сделанные на этой конференции, нашли свое отражение в сборнике «Вопросы биохимии нервной системы», изданном в 1957 году.

Исследования, проведенные с 1957 по 1962 год, были подытожены на третьей Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, состоявшейся в апреле 1962 года в Ереване. Труды этой конференции были опубликованы в сборнике «Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы», изданном в 1964 году.

На состоявшемся в январе 1964 года в Ленинграде I-ом Всесоюзном биохимическом съезде в числе других симпозиумов работал симпозиум «Биохимические основы нервной деятельности», на котором было сделано 27 докладов, посвященных различным вопросам биохимии нервной системы. Статьи, написанные на основе этих докладов, вошли в сборник «Проблемы нейробиологии», изданный в 1966 году.

За время, прошедшее после третьей Ереванской конференции, научные исследования в области биохимии нервной системы в нашей стране расширились. Был изучен ряд новых

вопросов, использованы новые методы исследований. В связи с этим возникла необходимость подытожить проведенную за это время работу, что и явилось задачей четвертой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, состоявшейся в г. Тарту в июне 1966 года, организованной Научным советом АН СССР по проблеме «Биохимия животных и человека» (его секцией «Биохимия нервной системы»), Тартуским государственным университетом и Институтом биохимии АН Укр. ССР. Доклады, сделанные и обсужденные на четвертой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы в Тарту, напечатаны в настоящем сборнике.

На этой конференции было сделано свыше 70 докладов, которые наглядно показывают широкое развитие исследований по биохимии нервной системы в различных лабораториях Советского Союза за последние 4 года и отражают пути и применяемые советскими биохимиками методы изучения различных вопросов столь важной области биохимии, какой является биохимия нервной системы.

Из настоящего сборника видно, что основным направлением исследований по-прежнему является изучение функциональной биохимии мозга, имеющее целью дать биохимическую расшифровку основных функциональных состояний нервной системы. Вместе с тем, как показывает сборник, наряду с изучением вопросов функциональной биохимии, широко разрабатываются вопросы биохимической статистики и динамики головного мозга и других отделов нервной системы, без глубокого изучения которых невозможно решение ряда вопросов функциональной биохимии.

По количеству докладов на первом месте стоят работы, посвященные различным вопросам азотистого обмена и белкам нервной системы, а также нуклеиновым кислотам и ферментам нервной ткани. Эти исследования выполнены как на клеточном, так и на субклеточном уровнях.

Как видно из статей, помещенных в разделе «Липиды мозга и их обмен», исследования в этой области получили свое дальнейшее развитие: изучались жирные кислоты, липиды, фосфолипиды, ганглиозиды, цереброзиды и их обмен как в целом мозге, так и в субклеточных фракциях мозга разных классов позвоночных.

Продолжалось изучение вопросов углеводного обмена, в частности, вопросов синтеза гликогена, роли гексозомонофосфатного шунта и глюкуронатного пути обмена глюкозы.

Статьи сборника показывают, что советские биохимики продолжали изучение медиаторов, биогенных аминов мозга и их обмена, а также влияния различных факторов (гипотермия, гипоксия, ионизирующая радиация, травматический шок) на обмен веществ нервной системы.



О том, как расширились за последнее время и углубились исследования в области биохимии нервной системы, говорят исследования действия психотропных средств на процессы обмена веществ в головном мозгу, сближающие биохимические исследования с психофармакологическими и преследующие цель найти пути восстановления нарушенного обмена при патологических состояниях головного мозга. Были представлены также доклады, посвященные изучению одной из самых важных функций высших отделов головного мозга, связанной с высшей нервной (психической) деятельностью, каковой является память. Эти вопросы нашли свое отражение в соответствующих статьях, помещенных в настоящем сборнике.

Как можно видеть из статей, помещенных в сборнике, советские биохимики за 1962—1966 годы получили ряд результатов, представляющих большой интерес как с теоретической точки зрения, так и с точки зрения их практического применения.

А. В. ПАЛЛАДИН  
Л. Я. ТЯХЕПЫЛЬД

## ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

А	— адреналин
АДФ	— аденозиндифосфорная кислота
АКТГ	— адренокортикотропный гормон
АМФ	— аденозинмонофосфорная кислота
АТФ	— аденозинтрифосфорная кислота
АТФаза	— аденозинтрифосфатаза
АХ	— ацетилхолин
АХЭ	— ацетилхолинэстераза
ГАМК	— γ-аминомасляная кислота
ГДК	— глутаматдекарбоксилаза
ГДФ	— гуанозиндифосфорная кислота
ГМШ	— гексозомонофосфатный шунт
ГМФ	— гуанозинмонофосфорная кислота
ГТФ	— гуанозинтрифосфорная кислота
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазa	— дезоксирибонуклеаза
ДНП	— дезоксирибонуклеопротеид
ИМФ	— инозинмонофосфорная кислота
ИТФ	— инозинтрифосфорная кислота
КА	— катехоламины
КоА	— коэнзим А
КФ	— креатинфосфат
МАО	— моноаминоксидаза
МКФ	— международная классификация ферментов
НА	— норадреналин
НАД	— никотинамидадениндинуклеотид
НАД·Н <sub>2</sub>	— никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
НАДФ	— никотинамидалениндинуклеотидфосфат
О.У.А.	— относительная удельная активность
п-ХМБ	— парахлормеркурибензоат
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РНКазa	— рибонуклеаза
РНП	— рибонуклеопротеид
У. А.	— удельная активность
УДФ	— уридиндифосфорная кислота
УТФ	— уридинтрифосфорная кислота
УФ	— ультрафиолетовый
ФП	— фосфопиридоксаль
ФХ	— фосфатидилхолин
ФЭА-а	— фосфатидилэтаноламин ацильный
ФЭА-п	— фосфатидилэтаноламин плазмалогенный
ХА	— холинацетилаза
ХЭ	— холинэстераза
ЦНС	— центральная нервная система
ЩУК	— щавелевоуксусная кислота
ЭАЭ	— экспериментальный аллергический энцефаломиелит

## БИОХИМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПСИХОТРОПНЫЕ ВЕЩЕСТВА \*

А. В. Палладин

Институт биохимии Академии наук Укр. ССР, Киев

Одна из основных задач биохимии головного мозга, особенно его высших отделов, заключается в том, чтобы расшифровать биохимические процессы, лежащие в основе различных психических состояний человека с тем, чтобы с помощью специально подобранных фармакологических психотропных средств эти процессы можно было возвращать к норме в случае их нарушения.

Исследования последнего времени показали, что соотношения процессов торможения и возбуждения в коре и подкорковых центрах головного мозга определяются в значительной мере состоянием обмена моноаминов (1).

Моноамины, а именно серотонин (5-окситриптамиин) и катехоламины (КА), к числу которых относятся норадреналин (НА) и дофамин (3,4-диоксифенилэтиламин), тесно связаны с функциональным состоянием нервной системы. Считают, что нарушения обмена моноаминов в связи с дефектами ферментов их образования или распада могут играть существенную роль в развитии нервных и психических заболеваний (2).

Многие психофармакологические, психотропные средства, которыми пользуются в психиатрии для борьбы с психозами, селективно угнетают действие ферментов, которые участвуют в образовании или разрушении в организме физиологически активных моноаминов.

---

\* По результатам исследований, выполненных при участии сотрудников отдела биохимии нервной системы (зав. акад. А. В. Палладин) и биохимической фармакологии (зав. проф. С. И. Балувев) Института биохимии АН Украинской ССР Е. Е. Гончаровой, Е. П. Готовцевой, В. И. Кочерги, А. А. Мусьялковской, Л. С. Смерчинской, Н. И. Стрижовой-Саловой и Я. Т. Терлецкой.



Ферментом, катализирующим дезаминирование моноаминов, является митохондриальная моноаминоксидаза (МАО). Влияя на МАО, тормозя ее, можно влиять на обмен (дезаминирование) моноаминов (3).

Психотропные вещества, являющиеся «ингибиторами МАО», находят большое применение в медицинской практике для лечения депрессивных состояний. Применение таких ингибиторов МАО для лечения ряда психических расстройств представляет собой один из наиболее ярких примеров практического использования достижений биохимии нервной системы и биохимической фармакологии.

В результате успешного применения ингибиторов МАО в клинической медицине для лечения ряда психических заболеваний многие авторы стали считать, что клиническая эффективность таких психотропных средств находится в соответствии с их способностью тормозить МАО и повышать содержание серотонина и НА в мозгу.

Однако в последнее время стали появляться данные, указывающие на то, что терапевтическое действие ингибиторов МАО обуславливается не только торможением ими активности МАО.

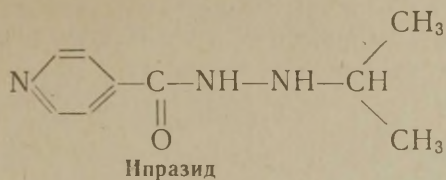
В работах, посвященных выяснению биохимических основ действия ингибиторов МАО, изучалось в основном их действие на активность МАО и на обмен серотонина и КА. О влиянии этих веществ на другие стороны обмена веществ в мозгу имеются лишь немногочисленные отрывочные данные. Между тем, выяснение влияния психотропных средств и на другие стороны обмена веществ в мозгу необходимо для расшифровки механизма действия этих препаратов, что позволило бы уточнить показания к применению их в клинике. Необходимо оно и для выяснения связи между функциональным состоянием и соответствующими биохимическими изменениями в мозгу, вызванными психотропным веществом.

В связи с этим мы предприняли систематическое изучение влияния ингибиторов МАО на процессы азотистого и углеводного обмена параллельно с изучением их влияния на активность МАО, содержание моноаминов в мозгу и на функциональное состояние нервной системы и всего организма. С целью выяснения роли серотонина в механизме действия ингибиторов МАО изучалось также его влияние на некоторые стороны обмена веществ, в первую очередь азотистого.

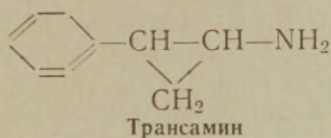
Мы изучали два ингибитора МАО: ипразид и трансамин. Оба они являются ингибиторами МАО, но имеют различную химическую природу (3).

Ипразид (ипрониазид, 2-изопропил-1-изоникотинилгидразин) является одним из первых ингибиторов МАО гидразиновой природы, применявшихся в клинической практике. Способность ипразида тормозить МАО была установлена в 1952 году, а его

широкое применение с терапевтической целью для лечения депрессивного состояния было начато с 1957 года.



Трансамин (парнат, тронилципромин, СКФ-385, транс-2-фенилциклопропиламин) является одним из сильнейших ингибиторов МАО. По своей химической природе он сходен с амфетамином. В СССР трансамин синтезирован в 1960 году и считается одним из наиболее быстро действующих антидепрессантов, имеющих небольшой побочный эффект.



Оба эти психотропных средства широко применяются в медицинской практике.

Мы применили их на разных видах животных: кроликах, кошках и собаках, причем поставили две серии опытов. В одной серии животным вводили ипразид и трансамин однократно (ипразид в дозе 100 мг/кг веса животных за 17 часов до их забоя, а трансамин — в дозе 10 мг/кг веса тела за 4—6 часов до забоя).

В другой серии опытов мы применили хроническое введение психотропных средств так, как это делается в клиниках: их вводили ежедневно, в течение трех недель, в малых количествах (ипразид по 10 мг на кг веса, а трансамин по 1 мг на кг веса).

Прежде всего мы исследовали (4) их влияние в условиях наших опытов на активность фермента МАО (Е. П. Готовцева) и на содержание серотонина и НА (В. И. Кочерга).

Эти исследования показали, что ипразид как при однократном, так и при хроническом введении вызывает у кроликов понижение активности МАО на 60—67% и повышает содержание серотонина в 3,5 раза по сравнению с нормой, а содержание НА — в 1,5 раза. При введении ипразида собакам как в опытах с однократным введением 100 мг на кг, так и при хроническом введении 10 мг/кг ежедневно, активность МАО в головном мозгу собак снижается на 80—60%, содержание серотонина повышается в среднем в 2 раза; содержание НА не меняется.

Таким образом, у собак при введении ипразида при более выраженном торможении активности МАО (на 80%) происхо-



дит менее значительное увеличение содержания серотонина в мозгу (в 2 раза), чем у кроликов (соответственно 60% и 3,0—3,5 раза). Ипразид в разных дозах вызывает в мозгу собак различное угнетение активности МАО (на 60% и 80%), но одинаковое увеличение уровня серотонина (в 2 раза).

Большие дозы трансамина вызывают у собак более выраженное торможение активности МАО (на 73—75%) и более значительное повышение содержания серотонина в мозговой ткани (в 2 раза), чем малые дозы (соответственно 69% и 1,5 раза).

У кроликов трансамин в хронических опытах вызывает снижение активности МАО на 65% и повышение содержания серотонина в 2,5 раза, а НА — в 1,5 раза.

У собак трансамин не вызывает изменений в содержании НА, если он вводится в хронических опытах в небольших количествах; под влиянием больших доз трансамина содержание НА у собак несколько увеличивается.

Таким образом, эти наши данные, подтверждая и расширяя литературные данные, говорят о том, что психотропные вещества типа ингибиторов МАО — ипразид и трансамин, тормозя почти одинаково активность МАО, по-разному влияют на концентрации серотонина и НА в головном мозгу разных видов животных: у собак повышается только содержание серотонина, у кроликов — и серотонина, и НА; у кроликов концентрация серотонина повышается более значительно, чем у собак.

Эти различия, может быть, объясняются тем, что окислительное дезаминирование не играет основной роли в превращении НА в головном мозгу собак; не исключена возможность его превращения путем О-метиличирования, или окисления до хиноидных продуктов. Может быть, у собак имеет место быстрый выход НА в кровяное русло, а циркулирующий НА в основном подвергается О-метиличированию, которое без сомнения играет важную роль в инактивации КА.

Не следует, однако, думать, что все ингибиторы МАО не вызывают изменений в содержании НА в мозгу собак и кошек, ибо, по литературным данным, катрон, например, повышает содержание НА в мозгу кошек, а ниаламид повышает содержание НА в головном мозгу собак.

Очевидно, влияние ингибиторов МАО на обмен моноаминов зависит и от их химической природы.

Прежде чем перейти к описанию наших опытов, в которых мы изучали влияние ипразида и трансамина на процессы азотистого и углеводного обмена в мозгу, я остановлюсь на наших исследованиях влияния этих ингибиторов МАО на функциональное состояние нервной системы и всего организма и на поведение животных.

Для выявления изменений функционального состояния ЦНС под влиянием ипразида и трансамина у собак со вживленными



в гипоталамическую область электродами исследовалась биоэлектрическая активность мозга (ЭЭГ) и миокарда (ЭКГ), возбудимость гипоталамуса (путем электростимуляции), кровяное давление, дыхание и общие поведенческие реакции (Н. И. Стрижова).

В изменениях функционального состояния ЦНС и всего организма, так же как и в биохимических изменениях, вызванных ипразидом и трансамином, имеются и общие черты, и существенные различия. Оба препарата обладают выраженным антидепрессивным действием. Ипразид и трансамин вызывают у собак активацию биопотенциалов головного мозга, повышение возбудимости гипоталамической области. Однако под влиянием ипразида у собак в большинстве случаев наблюдается состояние двигательного беспокойства, нарушение ходьбы, ускорение дыхания.

При хроническом введении малых доз ипразида у одной части собак отмечалось повышение тонуса парасимпатической (трофотропной) нервной системы: сужение зрачков, замедление ритма сердечных сокращений, дыхательная аритмия, некоторое «успокоение», а на второй неделе — агрессивность.

У второй, более многочисленной группы собак, наблюдалось повышение тонуса симпатической (эрготропной) нервной системы: расширение зрачков, учащение пульса, усиление двигательной активности, «суетливость».

Эту разницу в реагировании собак можно объяснить их типологическими особенностями и различным исходным функциональным состоянием вегетативных отделов их нервной системы.

Под влиянием хронического применения малых доз ипразида происходит небольшое увеличение амплитуды колебаний биопотенциалов гипоталамической области головного мозга без изменений их частоты.

Под влиянием малых доз трансамина у большинства собак наблюдалось увеличение спонтанной подвижности и проявление на ЭЭГ активации биопотенциалов гипоталамической области головного мозга.

Данные опытов с непосредственной стимуляцией гипоталамической области с помощью электронного импульсного стимулятора говорят о том, что трансамин снижает порог возбудимости подкорковых образований головного мозга.

Данные о функциональных изменениях под влиянием ипразида и трансамина указывают пути к расшифровке эмпирически установленного факта, что применение трансамина не показано при ажитированных депрессиях со страхом, а ипразид дает лучший терапевтический эффект при ажитированной и атипичной депрессии.

С целью выяснения влияния ипразида и трансамина на азотистый обмен в ЦНС мы изучали содержание в мозгу аммиака, глутамина, лабильных амидных групп белков и обменяемость

азота амидной группы глутамина и амидных групп белков, а также активность глутаминазы и глутамин-синтетазы.

Исследования (Я. Т. Терлецкая) показали, что при введении кроликам под кожу ипразида, вызывавшего увеличение содержания серотонина, в мозгу содержание глутамила снижалось. Это уменьшение содержания глутамина, по-видимому, не обусловливается изменениями в процессах синтеза или использования глутамина, так как в активности ферментов глутаминазы и глутаминсинтетазы не наблюдалось никаких изменений (5).

Оказалось далее, что введение ипразида не вызывает снижения содержания глутамина, если одновременно вводилась глутаминовая кислота.

Следовательно, при применении в психиатрических клиниках ипразида для лечения депрессивных состояний можно рекомендовать одновременное введение глутаминовой кислоты, чтобы избежать уменьшения содержания в мозгу глутамина. Так и поступают теперь в психиатрической больнице им. Павлова в Киеве, и это оказывает хорошее действие на терапевтический эффект применения ипразида.

У собак, у которых под влиянием ипразида наблюдались признаки повышения тонуса адренергической (эрготропной) системы, отмечалась тенденция к повышению содержания азота аммиака в мозгу без изменений в содержании азота глутамина и амидных групп белков.

У собак, у которых под влиянием ипразида наблюдается повышение тонуса холинергической (трофотропной) системы, изменений в содержании азота аммиака, амидных групп глутамина и белков в головном мозгу не происходит (Н. И. Стрижова).

Как показали опыты с использованием тяжелого изотопа азота, ипразид оказывает влияние на скорость обмениваемости азота аммиака и азота амидных групп белков.

Особого внимания заслуживает тот факт, что снижается также включение тяжелого изотопа в амидную группу глутамина, что, по-видимому, является следствием снижения концентрации метки в обменном фонде — во фракции аммиака (Я. Т. Терлецкая).

Трансамин не вызывает статистически достоверных изменений в азотистом обмене головного мозга собак, однако при больших дозах отмечается тенденция к повышению содержания азота аммиака и снижению содержания азота амидных групп глутамина (Н. И. Стрижова).

Большинство исследователей объясняет действие ипразида на обмен веществ в мозгу и на его функциональное состояние торможением МАО и повышением в связи с этим содержания серотонина. Чтобы проверить это, мы провели исследования с введением кроликам различных доз серотонина. Серотонин вводили интрацистернально, поскольку имеются данные о непроницаемости гематоэнцефалического барьера для серотонина. Эти



исследования не обнаружили каких-либо изменений в азотистом обмене мозга.

Можно было предположить, что введенный серотонин быстро разрушается МАО. Поэтому в другой серии опытов мы затормаживали действие МАО ипразидом, а затем уже вводили серотонин. И в этом случае серотонин не вызывал каких-либо специфических изменений в азотистом обмене мозга (Я. Т. Терлецкая).

По литературным данным, у кроликов после торможения МАО повышается содержание и серотонина, и НА, а у собак и кошек увеличивается только содержание серотонина, содержание же НА остается неизменным.

В связи с этим, мы поставили опыты на кошках и нашли, что у них серотонин не вызывал изменений в азотистом обмене мозга.

Поэтому, если согласиться с тем, что влияние ипразида обусловливается повышением содержания моноаминов в результате торможения МАО, то приходится сделать вывод, что дело сводится к повышению содержания НА, а не серотонина.

Мы провели далее изучение влияния серотонина на обновление белков головного мозга (6) и нашли (Л. С. Смерчинская), что серотонин вызывает снижение включения меченого метионина в суммарные белки мозга и в белки отдельных внутриклеточных компонентов мозговой ткани.

При повышении содержания эндогенного серотонина в мозгу, вызванном введением ипразида, интенсивность обновления как суммарных белков, так и белков отдельных клеточных фракций ткани мозга также снижается. При совместном введении ипразида и серотонина это снижение оказывается еще более значительным. Таким образом, влияние ипразида на обновляемость белков мозга, по-видимому, является следствием торможения им МАО и повышения в результате этого содержания серотонина, хотя под влиянием ипразида в мозгу кроликов повышается также содержание НА.

Так как содержание серотонина неодинаково в различных отделах ЦНС, мы изучили влияние ипразида на скорость обновления белков в различных отделах головного мозга. В этих опытах определялась скорость включения в белки мозга радиолизина, меченого  $C^{14}$ . Исследования показали (Л. С. Смерчинская), что под влиянием ипразида интенсивность включения меченого лизина в белки различных отделов мозга снижается неодинаково: наибольшее снижение было выявлено в варолиевом мосту и в четверохолмьи.

Под влиянием ипразида избирательно повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера для меченого лизина.

Поскольку основным энергетическим ресурсом для работы мозга являются углеводы, интересно было выяснить, как влияет



ипразид или вызванное им накопление моноаминов в головном мозгу на процессы углеводного обмена.

С этой целью мы определяли содержание гликогена, глюкозы и молочной кислоты и активность гексокиназы в мозгу опытных животных (7).

Исследования показали (Е. Е. Гончарова), что при однократном введении вышеуказанных больших доз ипразида содержание гликогена в мозгу кроликов резко повышается (в среднем в 2,5 раза, а то и больше). В то же время содержание глюкозы, молочной кислоты и активность гексокиназы почти не меняются. Статистически недостоверное повышение содержания глюкозы и снижение активности гексокиназы, отмеченные в этих опытах, не могут объяснить значительное повышение содержания гликогена в мозгу кроликов.

Аналогичные опыты на кошках (в мозгу которых под влиянием ипразида повышается в основном только содержание серотонина, в то время как в мозгу кроликов повышается содержание и серотонина и НА) обнаружили лишь небольшое увеличение содержания гликогена в мозгу.

В опытах на собаках после введения ипразида существенных изменений в показателях углеводного обмена не наблюдалось: содержание гликогена в мозгу не повышалось, не изменялись также содержание глюкозы, молочной кислоты и активность гексокиназы.

Таким образом, ипразид у разных видов животных оказывает различное влияние на содержание гликогена в мозгу.

Содержание гликогена в мозгу кроликов под влиянием трансамина (однократное введение) не повышается, а в мозгу собак обнаруживается тенденция к уменьшению. Напрашивается вывод, что повышение содержания гликогена в мозгу кроликов под влиянием ипразида является результатом непосредственного влияния на углеводный обмен самого ипразида или продуктов его обмена, а не торможения моноаминоксидазы.

При хроническом введении кроликам больших доз ипразида мы снова выявили повышение содержания гликогена в мозгу, хотя менее значительное, чем при однократном введении его больших доз (на 24%). Остальные показатели углеводного обмена, как-то: содержание глюкозы и молочной кислоты в мозгу и активность гексокиназы — обнаружили только некоторое снижение.

Опыты на собаках показали, что и при хроническом введении ипразида в их мозгу не наблюдается изменений ни в содержании гликогена, ни в содержании глюкозы, ни молочной кислоты. Несколько снижается активность гексокиназы.

Таким образом, и хронические опыты показали, что ипразид неодинаково влияет на содержание гликогена в мозгу кроликов и собак.

Хронические опыты с трансамином не обнаружили у собак каких-либо изменений в содержании гликогена, глюкозы, молочной кислоты и в активности гексокиназы.

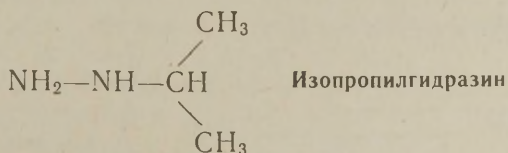
Таким образом, сравнивая действие ипразида и трансамина на некоторые показатели углеводного обмена и особенно на содержание гликогена, мы видим, что результаты их влияния неодинаковы, хотя оба они являются ингибиторами МАО.

Напрашивается вывод, что оба ингибитора оказывают влияние на углеводный обмен не путем торможения активности МАО и повышения в результате этого содержания моноаминов. Ипразид и трансамин, в общем одинаково тормозя активность МАО и повышая содержание в мозгу моноаминов, по-разному влияют на содержание гликогена: ипразид повышает, а трансамин в больших дозах проявляет тенденцию даже к снижению его содержания. Остается допустить непосредственное влияние самого ипразида и трансамина или продуктов их обмена на содержание гликогена в мозгу.

Возникает далее вопрос — чем объясняется разница в действии различных ингибиторов МАО? Напрашивается мнение о том, что различие обусловливается различной химической природой ингибиторов, однако не исключено влияние и других факторов. В связи с этим интересно упомянуть данные, полученные в 1962 году Хорита и Матсумото. Они нашли, что ингибиторы МАО, содержащие гидразиновую группу (ипразид, фенелзин и другие), могут реагировать с пируватом натрия, в результате чего их активность снижается. Такими же антагонистами ингибиторов МАО оказались и другие карбонилсодержащие агенты, как например  $\alpha$ -кетоглутаровая, щевелевоуксусная и другие кислоты. Они могут снижать активность гидразиновых ингибиторов МАО, встречаясь с ними в животном организме. По отношению к трансамину пируват натрия антагонистическими свойствами не обладает.

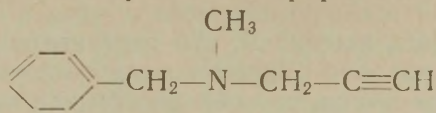
С целью проверить, не является ли вызываемое ипразидом повышение содержания гликогена в мозгу результатом непосредственного влияния самого ипразида или продуктов его обмена (а не торможения моноаминов) на углеводный обмен, мы провели (8) следующие исследования (А. А. Мусьялковская).

Во-первых, изучили действие других ингибиторов МАО гидразиновой и негидразиновой природы на углеводный обмен. Из ингибиторов гидразиновой природы мы изучили действие изопропилгидразина, который через 7 часов после подкожного вве-



дения в количестве 60 мг на кг веса кроликов вызывал торможение МАО на 85%. Однако при этом никаких изменений в содержании гликогена не наблюдалось.

Из ингибиторов негидразиновой природы мы взяли паргиллин,



Паргиллин (N-метил-N-бензил-пропилиламин)

который, судя по литературным данным, при внутривенном введении 10 мг/кг через 4 часа вызывает у кроликов торможение МАО в мозгу на 95—100%. И этот ингибитор, хотя сильно тормозит активность МАО и вызывает, стало быть, сильное увеличение содержания моноаминов, также не оказывает влияния на содержание гликогена в мозгу кроликов.

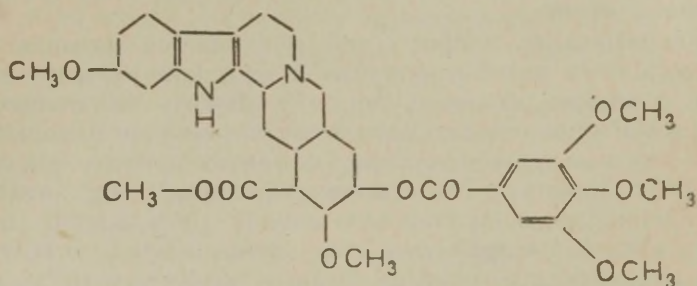


Рис. 1. Резерпин.

Мы испытали также влияние на гликоген мозга резерпина, который снижает содержание моноаминов в мозгу. Можно было думать, что если увеличение содержания моноаминов в мозгу обуславливает повышение содержания гликогена, то уменьшение количества моноаминов должно также оказывать какое-то влияние на обмен углеводов. Однако внутривенное введение кроликам резерпина в количестве 2,5 мг на кг веса на 4 часа также оставалось без влияния на содержание гликогена в мозгу.

Остается предположение о прямом влиянии самого ипразида или продуктов его обмена на обмен гликогена.

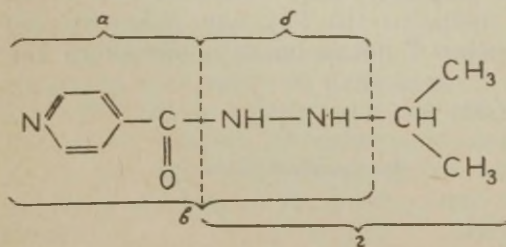


Рис. 2. Предполагаемые продукты обмена ипразида.

а — изоникотиновая кислота,  
б — гидразин, в — изониазид,  
г — изопропилгидразин.

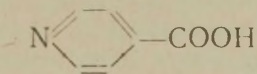


Имеющиеся в литературе данные говорят о возможности расщепления ипризида с образованием изоникотиновой кислоты и изопропилгидразина. Имеются также данные, говорящие о возможности отщепления изопропильной группы ипризида.

С целью выяснить, может ли и какой именно из продуктов обмена ипризида вызывает повышение содержания гликогена в мозгу кроликов, мы изучили влияние этих предполагаемых продуктов обмена ипризида на содержание гликогена в головном мозгу. При этом влияние продуктов обмена ипризида изучалось в дозах, эквивалентных их содержанию в молекуле ипризида.

Исследования показали, как уже сказано выше, что введение кроликам подкожно 60 мг на кг изопропилгидразина через 7 часов не вызывало каких-либо изменений в содержании гликогена в мозгу. Не было изменений и через 17 часов после введения.

Введение изоникотиновой кислоты (подкожно) в виде натрие-

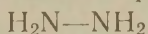


Изоникотиновая кислота

вой соли в дозе 59 мг/кг за 17 часов до забоя кроликов также не вызывало изменений в содержании гликогена.

Поскольку неизвестно, проникает ли изоникотиновая кислота через гематоэнцефалический барьер, в ряде опытов мы вводили ее интрацестернально в дозе 15 мг/кг веса. Однако и при таком введении изоникотиновой кислоты не было найдено изменений в содержании гликогена в мозгу.

Далее мы испытали введение кроликам гидразина в дозе



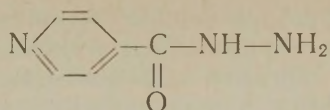
Гидразин

40 мг/кг веса. При его введении за 1 ч. 20 мин. — 1 ч. 30 мин. до забоя, когда он уже оказывает влияние на содержание моноаминов в головном мозгу, мы не наблюдали изменений в содержании гликогена в головном мозгу.

Однако если гидразин вводился за 17 часов до забоя, т. е. за такой же промежуток времени, как и при введении ипризида, то содержание гликогена в головном мозгу увеличивалось.

Таким образом, один из возможных продуктов расщепления ипризида в головном мозгу, а именно гидразин, вызывает повышение содержания гликогена в мозгу: если у контрольных животных содержание гликогена составляло 75,6 мг%, то через 17 часов после введения гидразина оно повышалось до 169,7 мг%.

Наконец, мы поставили опыты на кроликах с изониазидом, вводя его внутривенно в дозе 80 мг/кг веса животного. Опыты показали, что изониазид также вызывает сильное повышение



Изониазид

содержания гликогена в головном мозгу, причем это повышение было такого же порядка, как и при введении ипразида: если у контрольных животных содержание гликогена составляло 70—75 мг%, то после введения изониазида оно повышалось до 145 мг%.

Такое повышение содержания гликогена наблюдается через 17 часов после введения изониазида, т. е. через такой же промежуток времени, через который мы наблюдали изменения в содержании гликогена под влиянием введения ипразида, а также гидразина. Через 4—8 часов после введения изменений в содержании гликогена не наблюдалось.

Таким образом, эти данные снова говорили о том, что при введении ипразида изменения в содержании гликогена в мозгу обуславливаются не изменениями в содержании моноаминов (увеличением их содержания в результате торможения МАО, вызываемого ипразидом), а действием самого ипразида на углеводный обмен, в частности, образующимися при расщеплении ипразида продуктами его обмена — изониазидом и гидразином.

Поскольку имеющиеся в литературе данные говорят о возможности влияния изониазида на пиридоксальфосфат, содержание которого под влиянием изониазида снижается, можно думать, что тем самым снижается активность расщепляющего гликоген фермента фосфоорилазы, коферментом которого является пиридоксальфосфат.

С другой стороны, данные о влиянии на обмен гликогена изониазида и гидразина говорят о том, что превращения ипразида в организме кроликов проходят через стадии отщепления от его молекулы изопропильной группировки с образованием изониазида и расщепления его с образованием гидразина. Эти оба продукта превращения ипразида обуславливают такое же повышение содержания гликогена в головном мозгу кроликов, как и сам ипразид.

Таким образом, наши исследования, вскрывая различия в действии ипразида и трансамина на процессы обмена веществ в мозгу (в том числе на азотистый и углеводный обмен и на функциональное состояние), свидетельствуют о необходимости учитывать в клинической практике различия в механизме действия разных психотропных средств (в частности ипразида и трансамина) на биохимизм головного мозга. Хотя наши исследования не выявляют механизма антидепрессивного действия этих психотропных веществ, ровно как и роли серотонина, НА и их влияния на специфические стороны обмена веществ в головном мозгу и на высшую нервную деятельность, в том числе и на



психическую деятельность, однако они намечают пути дальнейших исследований, направленных на решение этих вопросов.

Необходимы дальнейшие нейрохимические и психофармакологические исследования с целью найти то общее биохимическое звено, от которого зависит антидепрессивное действие разных нейротропных средств.

Необходимо при этом исследовать определенные биохимические процессы не в целом мозгу суммарно, а в отдельных функционально различных его частях.

В этих исследованиях особое внимание следует обратить на белки мозга, на выявление специфических для определенных функций высших отделов нервной системы белковых веществ, а также на продукты белкового обмена и низкомолекулярные азотистые вещества, ибо несомненно, что с белками и их обменом связана специфика деятельности ЦНС, в частности ее высших отделов.

Уже из приведенных выше данных видно, что в механизме действия ипразида определенную роль играет влияние, оказываемое им на азотистый обмен головного мозга, отражающий состояние важнейших компонентов живой клетки — белковых веществ — и тесно связанный с функциональным состоянием ЦНС.

Биохимия, особенно в области изучения биохимии белков и нуклеиновых кислот и, в частности, процессов, происходящих на молекулярном уровне, идет вперед исключительно быстрыми шагами. Поэтому не будет ничего невероятного, если я выскажу надежду на то, что проблема выяснения биохимического механизма различных проявлений психической жизни, проблема овладения процессами высшей нервной деятельности будет решена в недалеком будущем. Нужна только настойчивая, целеустремленная работа нейрохимиков вместе с представителями смежных специальностей. А что может быть увлекательнее проникновения в тайны «самого высшего творения земного шара», как выразился Павлов, что может быть интереснее познания мозга, психической деятельности, чтобы затем активно вмешиваться во все тонкости умственной и эмоциональной жизни человека!

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tissot R., Encephale, 50, 106, 205, 1961, Presse medicale 70, 1359, 1962.
2. Соркс Т. Л., Журн. Всес. хим. о-ва им. Менделеева 9, 381, 1964.
3. Горкин В. З., Журн. Всес. хим. о-ва им. Менделеева 9, 405, 1964.
4. Кочерга В. И., Готовцева Е. П., Укр. біохім. ж. 39, 1966.
5. Терлецкая Я. Т., Укр. біохім. ж. 35, 552, 1963; Терлецкая Я. В., Палладин А. В., Писаревич Е. В., Укр. біохім. ж. 35, 783, 1963.
6. Смерчинская Л. С., Авдеев В. Г., Укр. біохім. ж. 36, 836, 1964.
7. Гончарова Е. Е., Мусялковская А. А., Укр. біохім. ж. 36, 829, 1964.
8. Мусялковская А. А., Укр. біохім. ж. 39, 1966.



## О БИОХИМИЧЕСКИХ ОСНОВАХ ПАМЯТИ

П. А. Кометнани

Институт физиологии Академии наук Грузинской ССР, Тбилиси

Память является основной функцией ЦНС. Под понятием памяти подразумевают способность животного к восприятию сенсорных раздражений, хранению и воспроизводству их.

Физиологи отличают два вида памяти: краткосрочную и долгосрочную память. Установлено, что первая стадия запоминания ограничивается возникновением изменений в проводящих структурах после возбуждения определенного набора нейронов. При этом процесс сопровождается циркуляцией импульсов по строго определенным кругам (реверберующие цепи Лоренте де Но, 1) в продолжение нескольких минут, и они уничтожаются электрическим током или другим интенсивным раздражением (2). Нужно думать, что краткосрочная память связана больше с физическими феноменами. Изменения в ЦНС, связанные с краткосрочной памятью, не успевают перерасти в заметные биохимические сдвиги.

Долгосрочная память может проявляться спустя несколько дней, месяцев и лет, она является результатом повторных раздражений или однократного сильного возбуждения. Имеются факты, свидетельствующие о том, что после многократного возбуждения цепи нервных кругов в них активируются процессы, связанные с превращениями белков, рибонуклеиновых кислот, нейромуморов и т. д.

### Физиологические основы памяти

При восприятии сенсорных раздражений обнаруживаются две характерные особенности. Первая заключается в том, что все сенсорные раздражения передаются в центр одним и тем же способом, — биотоками возбуждения, которые в зависимости от вида раздражения отличаются в основном частотой и амплитудой импульсов. Отсюда нужно сделать заключение, что информация в ЦНС воспринимается одним и тем же кодом. Другая

особенность восприятия сенсорных раздражений заключается в том, что биоток, передающий информацию, перекодируется в ЦНС посредством медиаторов не в одной клетке, а в наборе нейронов при помощи специальных нервных путей.

Одно из существенных отличий нервной ткани от других выражается в том, что регуляция ее функций осуществляется как на клеточном, так и преимущественно на межклеточных уровнях. Под межклеточной регуляцией подразумевают функционирование синаптических связей. Сенсорное раздражение воспринимается одновременно ассоциацией нейронов, которая со своей стороны взаимодействует с другими ассоциациями в определенной временной и пространственной последовательности. Взаимосвязь ассоциаций осуществляется синапсами.

Нейроны включают в себе тело клетки с дендритами и с аксоном. На дендритах и теле клетки имеется большое количество (до 1000) синаптических пучков, которые представляют собой окончания аксонов других нейронов. Как правило, каждый определенный набор нейронов контактирует с другим набором, и поэтому ЦНС реагирует на раздражение как целое.

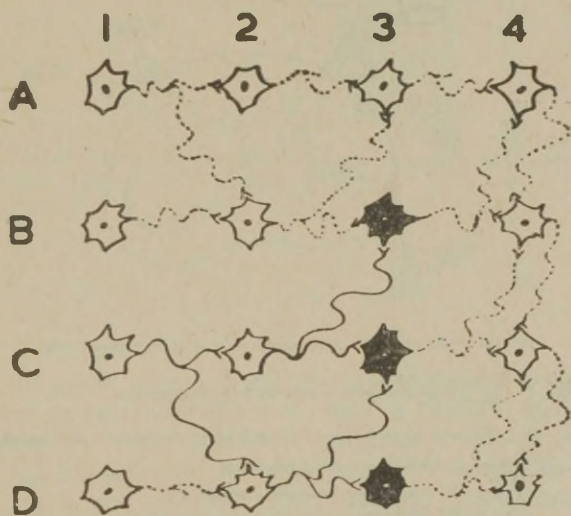


Рис. 1. Схема одного из возможных путей активации набора нейронов, состоящего из трех единиц.

На рис. 1 дана схема взаимосвязи одной комбинации нейронов, состоящей из трех единиц, которая функционирует при одном роде раздражений. Схема показывает, что раздражение воспринимается при распространении возбуждения от нейрона C1, и

посредством нейронов С2 и Д2 в процесс восприятия включаются нейроны В3, С3 и Д3.

Основные сведения о функции синаптической связи получены при изучении нервных окончаний в мышце, спинальных нейронов ганглионарных клеток. Только в самое последнее время, в результате разработки специальной микротехники, начали изучать характер взаимодействия нейронов в ЦНС.

Прямыми измерениями трансмембранной разности потенциалов в нейроне Эклс (3) показал, что возбуждение связано с уменьшением величины трансмембранного потенциала, т. е. с деполяризацией клетки. Тормозное состояние клетки выражается в гиперполяризации, в увеличении трансмембранного потенциала. Нейрон может оказаться под воздействием других нейронов и их возбуждающие и тормозящие эффекты суммируются алгебраически. Суммация в простом случае представляет процесс, когда два импульса, идущие по двум чувствительным нервам, каждый из которых недостаточен для вызова ответа, могут совместно дать эффект. Схема, приведенная на рис. 2, дает

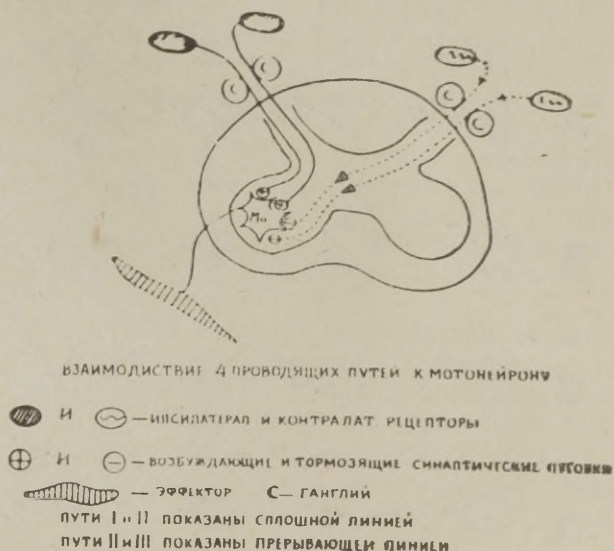


Рис. 2. Схема суммации импульсов раздражения в ответной реакции мотонейрона.

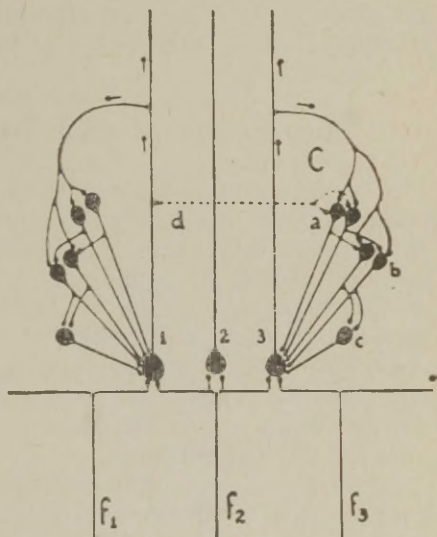
представление о взаимосвязи между импульсами возбуждения и торможения в мотонейроне спинального ганглия. Первый и второй путь (сплошная линия) проведения импульсов возбуждения, суммируясь во времени и пространстве, могут быть полностью



выключены импульсами торможения, идущими по третьему и четвертому путям (прерывистая линия).

Нервная активность связывается с циркуляцией импульсов в цепях нейронов. Считается наиболее вероятным, что при восприятии внешнего раздражения в возбужденных ассоциационных нервных кругах коры головного мозга возбуждение может вращаться некоторое время после восприятия, и в это время будут активироваться сперва сенсорные нейроны, а посредством последних — пирамидные нейроны. С первыми из них связывается восприятие периферического раздражения, а со вторыми — ответная реакция животного (Беритов, 4, 5).

Рис. 3. Схема циркуляции импульсов в реверберующих цепях по Лоренте де Но.



На рис. 3 дана диаграмма реверберующих цепей нейронов. В первой части рисунка область, окружающая букву С, может быть возбуждена импульсацией, идущей по волокну  $f_2$  или  $f_3$ , доходящей до нейрона 3. Возбуждение от нейрона 3 переходит на нейроны а, b и с посредством волокна 3. Нейроны а, b, с со своей стороны контактируют с нейроном 3, и цепь реактивируется.

По данным Бериташвили (27), продолжительность краткосрочной памяти, в основе которой, как полагают, лежит циркуляция импульсов возбуждения по нервным кругам, у собак ограничивается несколькими минутами. Память на одно зрительное или слуховое восприятие пищевого объекта не сохраняется долго. Но если зрительное или слуховое восприятие сочетается с включением вкуса и обоняния, то память о пищевом объекте у собак сохраняется неделями.

Лоренте де Но (6) в докладе на семинаре, организованном в 1961 г. Массачусетским технологическим институтом (США), разбирая вопрос связи циркуляции импульсов с памятью, пришел к выводу, что циркуляция импульсов может предшествовать и быть участником становления памяти, но в основе ее хранения и воспроизводства должны лежать субклеточные образования нейрона. Энграмма памяти не может быть выражена в циркуляции импульсов по нервным путям кроме всего прочего и потому, что объем хранимой в ЦНС информации во много раз превышает ту возможность, которую может дать циркуляция импульсов. Против принятия циркуляции импульсов как основы памяти говорит и тот факт, что она может быть полностью выключена вместе с краткосрочной памятью после интенсивного раздражения, а долгосрочная память остается без изменения.

### **Биохимические механизмы наследственной памяти**

Основным положением теории генетической памяти является утверждение, что различие генетических признаков обусловлено характером биохимических превращений, т. е. обменом веществ. Биохимические превращения катализируются ферментами, а ферменты являются белками. Отсюда делается вывод, что генетические признаки определяются активностью специфических белков-ферментов и ее регуляцией. В последние десять лет сделаны крупнейшие успехи в изучении путей синтеза белков и выявлении значения этого процесса в хранении и в воспроизводстве генетической информации.

Отправной точкой в выяснении механизма синтеза белка в клетке послужило обнаружение того факта, что те клетки, которые содержат больше РНК, более интенсивно синтезируют белок (Браше, 7 и Касперсон, 8). Принимается, что генетическая информация, которая записана в химической структуре ДНК, находит свое отражение в синтезе специфических белков.

Изучение синтеза адаптивных ферментов привело к заключению о наличии в ДНК определенных участков, где образуется специфический белок, репрессирующий активность структурного цистрона. Выдвигается ведущая роль ДНК в регуляции обмена веществ, в активации или прекращении синтеза ферментов.

По современным представлениям в основе иммунитета также лежит генетический механизм. Этот факт представляет для нас интерес потому, что иммунитет связан со способностью организма к сохранению и воспроизводству ненаследуемых, приобретенных в процессе индивидуальной жизни признаков, т. е. мы в данном случае имеем дело с аналогичными явлениями, характерными и для ЦНС. Как известно, иммунитет связан с синтезом специфических антител-белков. Синтез этих белков активируется

антигеном, и в этот процесс включается ряд клеток (Бернет, 9). Важным является то обстоятельство, что антиген реагирует с ДНК лимфоцитов, стимулируя механизм, подобный механизму, обеспечивающему образование адаптивных ферментов. Образовавшаяся здесь РНК-посредник мигрирует в плазматическую клетку, где происходит синтез специфического белка-антитела.



Рис. 4. Схема взаимодействия клеточных систем, принимающих участие в синтезе белка-антитела.

На рис. 4 представлена диаграмма, дающая представление о взаимосвязи вышеназванных клеток с лейкоцитами и эритроцитами.

Горовиц (10), разбирая вопрос образования антител и связь этого процесса с проблемой кодирования, приходит к выводу, что антиген действует не только на матричные свойства ДНК. Он утверждает, что антигенный детерминант вызывает изменения в конформации пептидных цепей антитела, синтезируемого в рибосомах. РНК-посредник диктует последовательность аминокислот, а конформация белка модифицируется антигенным детерминантом (см. рис. 5). Этот факт имеет значение для выяснения характера участия гормональных агентов в явлениях обучения и памяти.

Имеется ряд фактов, указывающих, что обмен белков и РНК в ЦНС имеет прямое отношение к явлениям памяти. Прежде



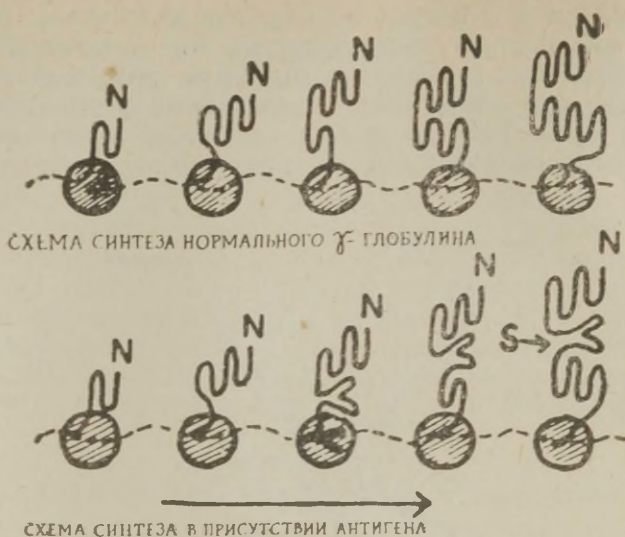


Рис. 5. Схема показывает пять рибосом, связанных длинной нитью РНК-посредника (прерывистая линия). В нижней части, в третьей рибосоме, показано изменение, которое вносится антителом-детерминантом.

всего нужно указать на исследования лаборатории А. В. Палладина (11, 12), которыми было установлено, что белки в головном мозгу обновляются с большой скоростью, что наибольшей активностью обладают белки тех отделов ЦНС, которые богаты клетками. Вместе с тем было показано, что скорость обновления белков связана с функциональным состоянием ЦНС. Было выявлено также, что из субклеточных образований по скорости обновления на первом месте стоят микросомы, т. е. та фракция, где концентрируются рибосомы. Аналогичные выводы были получены во многих других лабораториях (13, 14, 15). Существенным в этих исследованиях является обнаружение того факта, что в условиях физиологического раздражения в воспринимающих областях ЦНС усиливается как скорость обновления белков, так и их новообразование.

В свете современных достижений нейрохимии большой интерес представляют данные, полученные в лаборатории Е. М. Крепса (16), а также Г. Е. Владимирова (17, 18) в связи с изучением обмена РНК. Было показано, что скорость обновления меняется в связи с функциональным состоянием животного, и, что самое главное, после выработки условного рефлекса в участках ЦНС, имеющих отношение к условному раздражению, происходит усиление синтеза РНК. При сильных раздражениях, наоборот, со-

держание РНК снижается. Гейгер и его сотрудники (19) показали, что после раздражения плечевого сплетения в продолжение нескольких секунд в РНК соответственной сенсорно-моторной области головного мозга кролика наблюдается уменьшение содержания азота. Вместе с тем было обнаружено изменение нуклеотидного состава РНК. В нашей лаборатории Эдилашвили (20) было выяснено, что после введения крысам коразола и нембутала в головном мозгу наблюдаются заметные сдвиги как в содержании РНК, так и в их нуклеотидном составе (см. рис. 6).



Рис. 6. Изменение нуклеотидного состава РНК коры головного мозга крыс после воздействия возбуждающих и тормозящих веществ.

Певзнер (21) методом количественного цитохимического анализа нашел, что при физиологических раздражениях содержание РНК в соответственных нейронах увеличивается, а при истощающих снижается. Хиден (22, 23, 24, 25) провел обширные исследования обмена белков и РНК на клеточном уровне с помощью специальных методов ультрафиолетовой микроспектрофотометрии и микрохимического анализа. Полученные им данные позволяют заключить, что кратковременное адекватное раздражение приводит к повышению содержания РНК и белков, а интенсивное ведет к снижению содержания этих соединений.

Интенсивное обновление и новообразование белков может служить двум целям. Или при помощи их кодируется полученная информация и сохраняется в запасе или же мы имеем дело с обновлением структуры. Первое предположение не является обоснованным, так как обучение и накопление информации не сопровождается перманентным накоплением запасных белков. Более правдоподобно второе предположение, что образовавшиеся белки идут на обновление структуры, в частности — синаптических мембран. Синапсы чрезвычайно лабильны, разрушаются и при необходимости вновь образуются в процессе функ-

циональной деятельности нервной клетки (26). Поэтому многими авторами высказывается предположение, что информация, закодированная в РНК, реализуется в белках мембран (27, 28, 29).

В данный момент принимается, что нейрон функционирует во взаимосвязи с окружающими его глиальными клетками. Функциональной единицей ЦНС Галамбос считает нейрон со своими сателлитами, глиальными клетками (30, 31). Микрохимические и цитоспектрофотометрические исследования Хидена (32, 33) показали, что метаболическая активность нейрона находится под контролем нейроглии. Наиболее активное влияние оказывает нейроглия на синтез РНК и белков в нейроне. Все эти данные указывают на исключительную роль нейроглии в функционировании нейрона.

### Значение генетического механизма в явлениях памяти

Исходя из данных наличия связи между обменом белков и РНК, с одной стороны, и функциональным состоянием животного — с другой, Хиден разработал гипотезу о ведущей роли генетического механизма в явлениях памяти. Примененная им микроэлектрофоретическая техника позволила установить прежде всего отличие нуклеотидного состава ядерной и цитоплазматической РНК в нейроне и в глиальных клетках и их изменение в процессе физиологического раздражения (22, 34). Наибольший интерес представляют его опыты с тренировкой крыс на решение задачи добывания пищи. Тренировка включала раздражение вестибулярного аппарата. Производился анализ нуклео-



Рис. 7. Изменение нуклеотидного состава РНК в клетках Дейтерса головного мозга крыс после обучения (Хиден).



тидного состава РНК в клетках Дейтерса (25). Полученные Хиденом данные приведены на рис. 7.

Выясняется, что в опытах по обучению крыс наблюдаются значительные сдвиги в нуклеотидном составе ядерной РНК, т. е. в РНК-посреднике. Это выражается в увеличении аденина и в уменьшении урацила. Изменение в нуклеотидном составе ядерной РНК Хиден сумел получить также воздействием химических агентов (35). Испытанное им соединение вызывало увеличение содержания РНК, а также белков в нейроне за счет уменьшения их в нейроглии. Такой же эффект вызывает тофранил — возбуждающее средство, употребляемое в невропатологической практике. Представляет интерес факт, обнаруженный в нашей лаборатории, что этот процесс сопровождается увеличением соотношения глутамата к ГАМК, т. е. созданием условий для усиления состояния возбуждения.

В дальнейших своих исследованиях Хиден и его сотрудники (34, 35) уточнили характер изменения нуклеотидного состава РНК в вестибулярных нейронах и в нейроглии в зависимости от вида раздражения. Получены данные, из которых следует, что долговременное обучение связано с одного рода изменением нуклеотидного состава, а кратковременное — с другого рода изменением.

Хиден (22) высказал предположение, что фактором, обуславливающим образование РНК-посредника на ДНК, является та модуляция частот, которая по Тейлору (36) сопровождает процесс получения информации из внешней среды. Нужно думать, что модуляция частот регулярных электрических импульсов влияет на ионное равновесие в нейроне, в результате чего приводятся в действие генетические механизмы синтеза белка. Специфичность белка должна быть обусловлена характером модулированных частот и ионных сдвигов. Если импульсация продолжается достаточно долго или она повторяется через определенный промежуток времени, то создаются условия для взаимодействия этого белка с системой, образующей медиатор. Это вещество — медиатор — осуществляет связь данного нейрона с другими.

Хиден предупреждал, что развиваемое им представление имеет целью стимулировать дальнейшие исследования. В связи с утверждением Хидена о ведущей роли генетического механизма в кодировании памяти было предпринято много исследований и высказано остроумных предположений. В гипотезе Хидена неясным остается, во-первых, каким образом информация, получаемая в виде сенсорных импульсов, записывается в РНК и, во-вторых, — механизм воспроизводства хранимой информации. Уточнений требует также сам основной тезис гипотезы о ведущей роли РНК.

У нас нет никаких оснований полагать, что синтез белков в

головном мозгу идет каким-либо особым путем. Нужно думать, что та специфическая РНК в гипотезе Хидена, которой приписывается ведущая роль в кодировании памяти, является РНК-посредником. Эта РНК не сохраняется и, после переноса информации от ДНК к рибосомам, сейчас же разрушается. С другой стороны, существование следов памяти в продолжение долгого времени нельзя также связывать с неизменяемостью синтезируемых белков. Ни РНК, ни белок сами по себе способностью самовоспроизводства в нервной ткани не обладают. Синтез специфических белков в нейроне должен направляться тем регулярным механизмом, который заложен в ДНК (37).

### **Влияние веществ, ингибирующих синтез белков и РНК, на память**

С целью проверки утверждения, что синтез специфических белков связан с явлениями памяти, было предпринято много исследований влияния торможения синтеза белков на память. Одним из первых опытов в этом направлении были опыты Дингмана и Спорна (38) с применением 8-азагуанина. Это соединение легко включается в состав РНК, чем нарушается нормальный состав РНК, а отсюда и синтез белков. Было выяснено, что крыса после введения 8-азагуанина делала в 2 раза больше ошибок, чем в контроле. В опытах Чемберлена и др. (39) был получен более неопределенный ответ, хотя и в данном случае авторы склоняются к той мысли, что ненарушенный синтез РНК является условием для нормального функционирования ЦНС. Но при этом нужно заметить, что это условие является обязательным не только для ЦНС, но и для всех тканей животного организма.

Из других исследований влияния торможения синтеза белков на память животных представляют интерес опыты с применением актиномицина Д и пурамицина. Актиномицин Д (антибиотик) тормозит активирующее влияние ДНК на синтез РНК (40), а пурамицин — внедрение аминокислот в молекулу белка (41). В опытах Барондеса и Жарвика (42) с актиномицином изучалось торможение включения в РНК меченой оротовой кислоты и способность мышей сохранять следы прошлого опыта и выработку новых условных связей. Было показано, что интенсивнее метится РНК-переносчик (см. рис. 8).

Было обнаружено, что у мышей, которым вводился актиномицин Д, условный рефлекс убегания на удар электрического тока сохранялся. Эти опыты были повторены недавно (43) в связи с обнаружением Флекснером и др. (44) того факта, что пурамицин расстраивает память крыс, если антибиотик вводился в головной мозг одновременно в разных областях. Коэн и Барондес (43) показали, что в случае введенного однократно в раз-



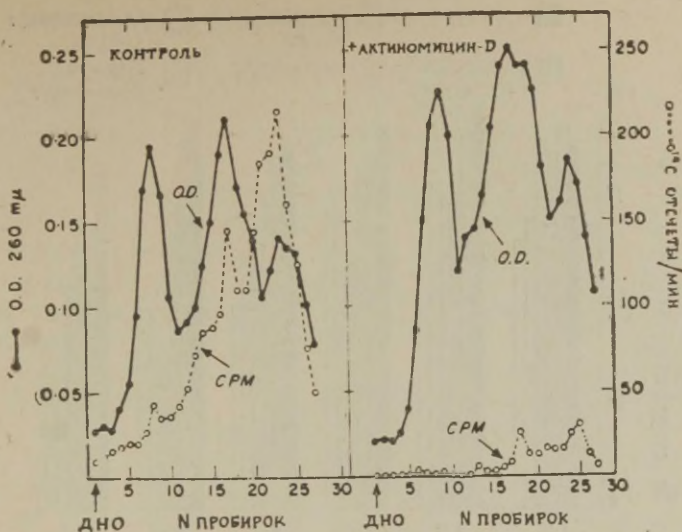


Рис. 8. Влияние интрацеребрального введения актиномицина Д на интенсивность внедрения меченой оротовой кислоты в разные фракции РНК головного мозга крыс (Барондес и Жарвик).

ные места головного мозга актиномицина Д синтез РНК тормозился на 95%. Но подопытные мыши в решении лабораторных задач не отличались от контрольных. Результаты опытов с актиномицином привели Барондеса (45) к заключению, что системе ДНК-РНК-белок нельзя приписывать ведущую роль в кодировании памяти. Хотя при этом он не отрицает участие генетического механизма в образовании синаптических связей.

У нас в Советском Союзе исследование влияния актиномицина 2703 на расстройство рефлексов и памяти было проведено Меерсоном и др. (46). Авторы приходят к выводу, что актиномицины не оказывают существенного влияния на уже выработанные двигательные-пищевые условные рефлексy, в то время как он резко тормозит выработку новых. Крылов и др. (47) в опытах интракраниального введения актиномицина пришли к выводу, что РНК несет ответственность за кодирование памяти.

Флекснер и др. (48, 49) в первых опытах с пуромидином также получили отрицательный ответ на существование связи синтеза белков с явлениями памяти. При интрацеребральной инъекции в область гиппокампа и в височную область синтез белка ингибировался на 95% (см. рис. 9) и нарушались условные связи оборонительного характера, которым мыши обучались в первые шесть дней обучения (короткая память).



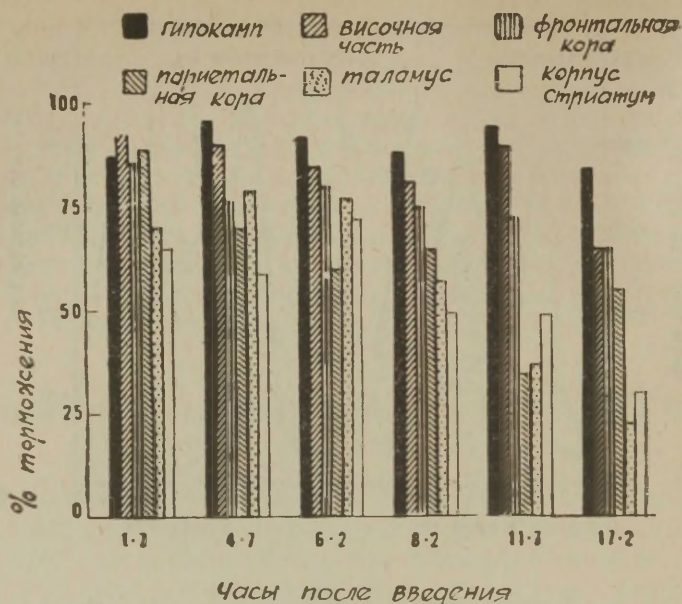


Рис. 9. Влияние интрацеребрального введения пурамицина на интенсивность внедрения меченого валина в белки разных отделов головного мозга крыс (Флекснер и др.).

Для того, чтобы нарушить условные связи продолжительной тренировки (долгая память), требовалось одновременное введение пурамицина в разные области головного мозга. Флекснер и др. в обзорной статье (44, 50) приходят к выводу, что память, связанная с аналитической деятельностью ЦНС, расстраивается только в том случае, если синтез белка будет заторможен в неокортексе. При этом Флекснер и др. не делают вывода, что память можно свести до уровня белковых макромолекул.

В литературе имеются указания о расстройстве памяти под влиянием интрацеребрально введенной рибонуклеазы (51, 52, 53). К сожалению, все эти исследования требуют контрольных дополнительных опытов. Встречаются и такие указания, что в условиях усиления синтеза РНК, у крыс улучшается способность решения задач, например, при даче 1,3 трициано-2-амино-1-пропена (35) или же при нагрузке животных дрожжевой РНК (54).

Таким образом, из многих данных, полученных при изучении влияния ингибиторов на синтез РНК и белка, следует заключить, что в процессы хранения и воспроизводства информации система ДНК-РНК-белок хотя и вовлекается, но этим не исчерпывается энграмма памяти.

К настоящему моменту считается доказанным, что проведение импульсов сопровождается изменением структуры проводящих путей. При повторных сенсорных раздражениях облегчается распространение импульсов по тем же путям вследствие положительного влияния со стороны нейронов, которые активировались при первом воздействии. Этим создаются условия для усиления активности синапсов при каждом повторном сенсорном воздействии (55, 56). Установлено, что энергия, потребляемая нервной тканью, в основном тратится на поддержание и новообразование структур, т. е. мембран и на синтез нейрогуморов. Поэтому естественно предположить, что интенсивный синтез белков в ЦНС связан со структурообразованием. Но нужно иметь в виду, что рост и изменение синаптических структур еще не говорит о том, как работает нервная клетка (Экклс, 55).

Данные электронной микроскопии позволили установить универсальность строения мембран (57, 58, 59). Важным для понимания функций мембран является тот факт, что повторяющимися структурными единицами мембран являются частицы со специфическими ферментами. Эти частицы выстраиваются в ряд, образуя трубчатые структуры — везикулы. В нейроне ферментная активность мембран связана с функцией ядра, митохондрий, рибосом, эндоплазматического ретикулума, а также с транспортом ионов и др. соединений, с генерированием биотока. Ферментная активность мембран изучается методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности (60, 61). Рис. 10 дает представление о распределении мембран в нервных окончаниях и их выделениях в виде отдельных фракций (Уиттэкер, 62).

Синаптические бляшки содержат несколько митохондрий и большое число везикул. В этих везикулах содержится медиатор, который под влиянием нервного импульса выливается в синаптическую щель (63, 64, 65).

Выясняется, что кроме ацетилхолина мощное возбуждающее действие на нейрон оказывают аминокислоты (66). В нервных окончаниях кроме ацетилхолина и катехоламинов концентрируется и 5-гидрокситриптамин, а также активно-метаболизирующиеся аминокислоты (глутамат, аспартат и ГАМК), принимающие непосредственное участие в функционировании нейрона. Нейрогуморы вызывают или деполяризацию, или гиперполяризацию нейронов. Отсюда следует заключить, что их действие связано с активным транспортом ионов. Взаимосвязь нейрогуморов с электрической активностью мембран приведена в виде схемы на рис 11.

Основная масса нейрогуморов находится в связанном с белками-носителями состоянии в особых хранилищах — везикулах. Введено новое понятие нейрохимического преобразователя (67),

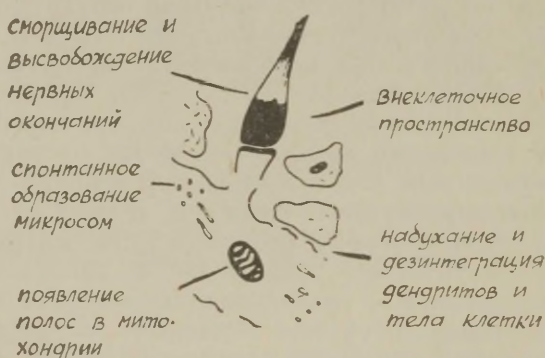
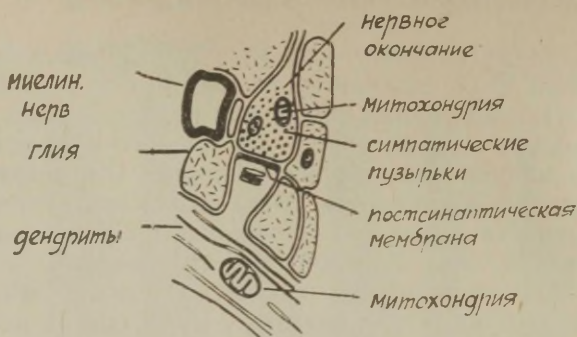


Рис. 10. Схема структуры нервного окончания и ее изменение в растворе сахарозы. В верхней части — нормальная ткань, внизу — ткань в растворе сахарозы (Уиттэкер).

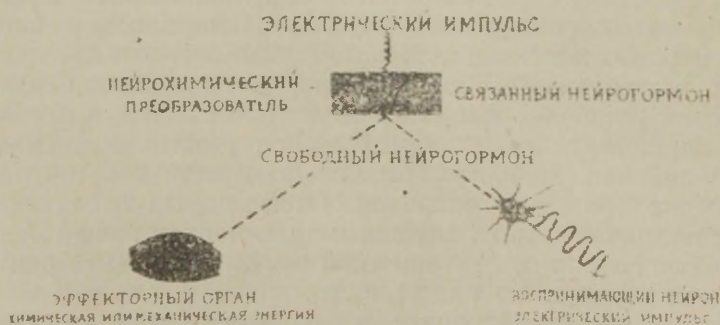


Рис. 11. Схема действия амина, освобождающегося из хранилища.



в котором происходит трансформация электрической энергии в химическую энергию медиатора. Под влиянием импульсации активная фракция медиатора освобождается из везикул и действует на эффектор.

Нейрогуморы оказывают влияние на электрические свойства мембраны или путем изменения их физико-химических свойств, или же изменения активности мембранных ферментов. Примером такого рода воздействий является обнаруженное в нашей лаборатории действие ацетилхолина на диэлектрический инкремент фосфолипидов (68) и изменение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активируемой АТФ-азы в мембранах нервных окончаний (69).

В литературе приводится указание о том, что модуляция частот вызывает эффект в РНК не ионными сдвигами, а мобилизацией нейрогуморов (70, 71). Это предположение исходит из данных о том, что регулирующее влияние ряда гормонов на обмен веществ обусловлено изменением конформации ферментов, т. н. аллостерическим переходом, который сказывается на активности фермента (72, 73). Можно допустить, что модуляция частот высвобождает гумор, который со своей стороны вызывает активацию регуляторного механизма ДНК. Но это предположение все еще не имеет экспериментальных доказательств. Те соединения, которые были получены до сих пор, действуют или на ферментные системы (например 3' и 5'-аденозинмонофосфат, 74), или на конфигурацию хромосом (37). Неизвестно, оказывают ли они какой-либо эффект на регуляторный механизм ДНК.

По Хидену (22, 75, 76) информация, которая кодируется в белке посредством РНК, реализуется реакцией с другим имеющимся в нейроне комплементарным белком. В результате этого в синапсе освобождается медиатор, посредством которого данный нейрон контактирует с другим. Высвобождение медиатора обеспечивает взаимосвязанное функционирование цепи нейронов, т. е. воспроизводство памяти. При воспроизводстве приходящие импульсы «познаются» уже существующими в нейроне кодированными белками. Предположение о наличии кодированного белка при воспроизводстве информации, также как и процесс записи приходящей информации, является все-таки предположением и требует экспериментального доказательства. Таким образом, в гипотезе Хидена только одно положение можно считать экспериментально доказанным — это функционирование системы ДНК-РНК в синтезе специфических белков.

### Критическая оценка других теорий памяти

После опубликования работ Хидена интерес к разработке теорий механизмов памяти сильно возрос. Появились сообщения, которые или дополняют имеющийся материал или освещают его по-новому. Ф. Шмитт (77, 78), разбирая вопрос преобразования

сенсорных импульсов в стабильную форму РНК, а также воспроизведение записанной энграммы, склоняется к той мысли, что эти процессы, разыгрывающиеся в макромолекулах, должны быть связаны с мембранными процессами, такими чисто физическими явлениями, как молекулярное электрическое возбуждение, внутримолекулярный перенос энергии, обратимые фотохимические и люминесцентные процессы, а также биологические структурированные микрополя.

В пользу наличия тесной взаимной связи между макромолекулярными сдвигами и биоэлектрическими явлениями, с одной стороны, и явлениями памяти — с другой, говорят исследования Моррелла (79, 80). Им было показано, что хроническое эпилептогенное повреждение, которое вызывалось локальным охлаждением небольшой области поверхности одного полушария головного мозга, вызывает появление эпилептоподобных разрядов в гомотопных участках другого полушария. Эти разряды со временем становятся независимыми и гомотопный участок «научается» разрядам, характерным для первичного повреждения. Важным является то обстоятельство, что эти изменения, возникшие в результате «обучения», сопровождаются сдвигами в содержании РНК.

Бриггс и Баррик (81) выступают против утверждения, что раздражение, поступающее в цепи в виде импульсации, может вызвать изменение в нуклеотидном составе, и полагают, что хранение информации связано с регуляцией синтеза ферментов и их активности продуцированными медиаторами. Аналогичной точки зрения на механизм хранения памяти придерживается и Смит (82).

Гайто (83) не отрицает значения системы ДНК-РНК-белок в кодировании, но высказывает сомнение в правильности интерпретации явлений следов памяти при помощи данных, полученных при изучении генетического кода. По его мнению кодирование РНК должно происходить особым, специфичным для головного мозга путем.

Гехтер и Халкерстон в своем обзоре о природе макромолекулярного кодирования на первый план также выдвигают ведущую роль генетического кода (71). Они пытаются доказать, что инструктирование синтеза специфических белков осуществляется не модуляцией частот, а нейрогуморами, продуцируемыми в нервных окончаниях. Он полагает, что нейрогуморы стимулируют образование 3', 5'-АМФ из АТФ. Известно, что 3', 5'-АМФ принимает участие в стимулировании ряда таких ферментных превращений, которые лежат в основе функции субклеточных образований (84). Нейрогуморы могут реагировать с рецепторными белками, образуя комплексы, которые функционируют как переносчики метильных групп от S-аденозил-метионина. Синтез последнего стимулируется 3', 5'-АМФ, образование кото-



рого обеспечивается активирующим действием опять-таки нейрогуморов (84).

В конечном итоге внедрение активированной метильной группы в РНК обуславливает «мутацию», за которой следует синтез нового специфического белка (85). Этот новый белок уподобляется антителу в иммунных реакциях. Воспроизводство полученной информации, по мнению Гехтера и Халкерстона, происходит теми же механизмами, какими антиген «вспоминается» антителом. Достоинством теории является возможность экспериментальной проверки отдельных положений. Таким образом, Гехтер и Халкерстон утверждают, что энграмма памяти включает кроме системы ДНК-РНК-белка и реакции, разыгрывающиеся в синаптических мембранах.

Ландейер (86) полагает, что раздражение сопровождается сдвигами проводимости, мембранных потенциалов и ионных градиентов концентрации, чем создаются условия для электрофоретического перехода РНК из глиальных клеток в нейроны. Состав РНК, переходящей в нейрон, определяется импульсацией, получаемой из периферии глиальными клетками. С другой стороны, импульсация в синаптических окончаниях освобождает в клетке нейрогуморы, которые индуцируют действие ферментов. Ферментными превращениями обеспечивается характерная для состояния данного нейрона импульсация. На эту импульсацию настраивается другой нейрон, и таким образом в явления памяти вовлекается вся ЦНС.

Обобщающая статья Дингмана и Спорна (70) привлекает к себе внимание тем, что авторы в основном оперируют собственными экспериментальными данными. Они считают РНК только участником записи и воспроизводства полученной информации, но не субстратом памяти. Они высказываются против предположения, что кодирование следов памяти ограничивается синтезом специфических белков. В этом процессе, по их мнению, должны участвовать гормоны, которыми активируются синтез РНК в клетке, а также мембранные процессы, обеспечивающие межнейронную связь. В старых теориях памяти на первый план выдвигалось новообразование дендритных связей. Тогда не была еще известна роль ДНК и РНК в механизме синтеза белка. В новых теориях ДНК и РНК предоставляется ведущая роль. Связующим мостом между этими теориями, по мнению вышеуказанных авторов, является то положение, что синтезируемый генетическим кодом белок идет на построение дендритной сети.

Высказывание Дингмана и Спорна (70) разделяется Гольдбергом (87). По мнению этого исследователя, генетическая память стабильна и генетические признаки без изменения переходят из поколения в поколение. Индивидуальная память не наследуема и всецело зависит от обучения. Она является, в отличие



от генетической памяти, ламаркистской. Энгранму нельзя довести до уровня только одного качества макромолекул.

Барондес (88) отрицает ведущую роль системы ДНК-РНК-белок в кодировании памяти. Он исходит из того положения, что в основе памяти лежит развитие синаптических связей и что белки только вовлекаются в этот процесс. Образование синаптических связей обуславливается повторными раздражениями. Поэтому для упрочения памяти необходимо время. Шок, вызванный электрическим раздражением, обуславливает потерю краткосрочной памяти, когда синаптические связи еще не упрочены. Сохранение памяти связано с постоянным обновлением белков, белки должны воспроизводиться. Это воспроизводство возможно не только посредством РНК, но и «трофическим» действием раздражения, т. е. посредством вновь образовавшегося синапса.

О роли медиаторов в функции ЦНС имеется обширная литература. Выяснены пути их образования и устранения, хранения и освобождения из специальных хранилищ — компартментов. Имеется ряд данных, проливающих свет на характер их действия, а также на место локализации эффектов, связанных с их превращениями. Но мы все еще мало знаем о значении медиаторов в поведении животных и, в частности, в явлениях памяти. Крех и др. (89, 90, 91) посвятили ряд исследований выяснению связи тренировки и обучения растущих крыс с холинэстеразной активностью головного мозга. Получены данные, которые указывают на наличие сдвигов в активности фермента в процессе тренировки. Особенно заметное усиление активности в связи с обучением было обнаружено в подкорковых образованиях, в то время как в коре она снижалась. Эти сдвиги оказались не закономерными, так как в изменившихся условиях тренировки обнаруживалась другая зависимость.

Хорошо известны соединения, которые снижают холинэстеразную активность в нервной ткани. Многие из них не проникают через барьер кровь-мозг, а некоторые являются сильнейшими ядами. Недавно была опубликована статья Дейча и др. (92), в которой были приведены данные влияния диизопропилфторфосфата при его введении в гиппокамп крыс: этот яд вызывал частичное расстройство памяти, если он был введен спустя 30 минут после обучения. Расстройство полностью восстанавливалось через 5 дней.

Холин также является ингибитором холинэстеразной активности. Но в отличие от других ингибиторов, он в малых дозах не оказывает заметного влияния на физиологическое состояние животного. Ингибирование обусловлено, по-видимому, эффектом обратной отрицательной связи. По данным наших лабораторий, холинэстераза подкорковых образований ингибируется гораздо интенсивнее, чем холинэстераза коры головного мозга (см. рис. 12).

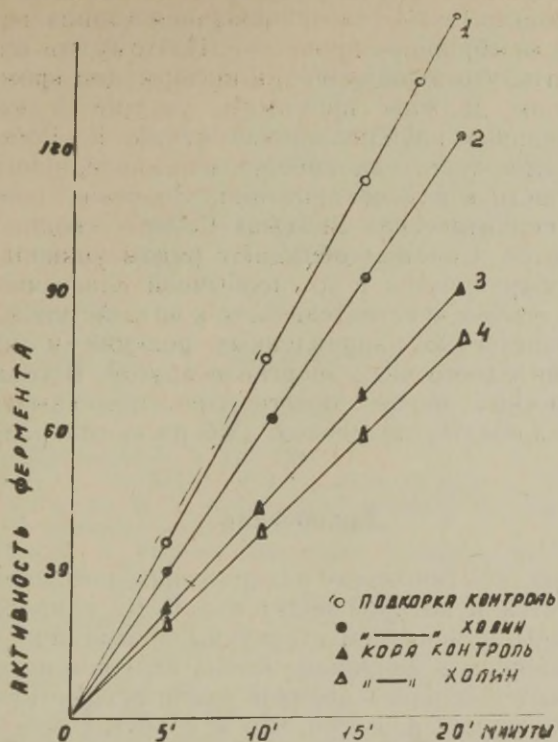


Рис. 12. Изменение активности холинэстеразы головного мозга крыс под влиянием холина.

Интересные данные были получены в нашей лаборатории Н. Алексидзе при изучении влияния холина на память растущих крыс. Были поставлены две серии опытов. В одной серии крысы тренировались на получение пищи при условном раздражении. После обучения крысы делились на две группы. Одной группе вводили подкожно холин (15 мг/кг), а другой — физиологический раствор (контроль). Сочетание условного раздражения с электрическим болевым на месте нахождения пищи в контрольной группе крыс в 90% случаев давал положительный эффект (т. е. контрольная крыса запоминала болевое раздражение), а в опытной группе этот эффект доходил только до 30% (т. е. крысы большей частью забывали болевое раздражение).

В другой серии опытов растущие крысы тренировались на решение лабиринтной задачи добывания пищи. После введения тренированным крысам холина уже спустя 1—2 часа в 60—70% случаев они теряли способность решения лабиринтных задач.

В вышеописанных опытах расстройство памяти введением холина должно вызываться ингибированием холинэстеразной активности, т. е. мембранных процессов. Поэтому эти опыты дают право заключить, что в кодировании информации кроме системы ДНК-РНК-белок должны принимать участие и мембранные реакции. В недавно опубликованной статье Е. Робертса (94) синапс рассматривается как кибернетическая единица, которая имеет способность к самоорганизации. Значение генетического механизма в синаптических системах Робертс сводит к синтезу белков-ферментов. Синапсы обладают рядом уникальных свойств, которые выражаются в их необычной пластичности и изменчивости, в особой чувствительности к воздействиям, в обеспечении пространственно направленных реакций и способности преобразования одного вида энергии в другой. В создании теории биохимических основ памяти синаптическим процессам должна принадлежать, по мнению Робертса, главная роль.

### Заключение

Установлено, что сенсорные раздражения, которые воспринимаются, хранятся и воспроизводятся в ЦНС, сопровождаются, с одной стороны, изменением структуры проводящих путей, а с другой — усилением в нейронах обмена белков и новообразованием РНК. Синтез белков в нервной ткани осуществляется теми же генетическими механизмами, что и в других органах и тканях, т. е. матричной системой.

Но природа синтезируемых белков, и в первую очередь — функциональных, остается совершенно неизвестной. Многочисленные попытки фракционирования белков привели к заключению о наличии тех или других ферментов-белков, но ни в одном случае не идентифицирован белок, непосредственно связанный с функцией нервной ткани. Утверждение о ведущей роли специфических белков в кодировании памяти первым долгом требует выяснения, что они из себя представляют.

Получение информации происходит посредством биоэлектрической импульсации. Но остается открытым вопрос, каким образом происходит перекодирование этих импульсов в системе, где хранится получаемая информация. Есть основание предполагать, что модулирование частот не непосредственно действует на генетический механизм, а между ними включается еще одно звено в виде нейрогуморов.

Нужно иметь в виду, что в функции нервной ткани, кроме внутриклеточных регуляторных механизмов, ведущее значение имеет межклеточная регуляция. Она осуществляется синаптическими мембранами, где разыгрываются биоэлектрические процессы, связанные с превращениями медиаторов. Синтез специфич-



ческих белков, по-видимому, должен иметь непосредственное отношение к процессам, происходящим на мембранах. Мы должны знать механизм действия медиаторов, ферментную активность мембран и значение биоэлектрической импульсации в интеграции нервных процессов.

Подытоживая вышесказанное, следует отметить, что только при учете взаимосвязи внутриклеточных процессов с межклеточной регуляцией, т. е. при условии выяснения связи генетического механизма с мембранными процессами, можно создать рациональную биохимическую теорию памяти.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lorente de Nó R., J. Neurophysiol., **2**, 402, 1939.
2. Chatfield P. O., Lyman C. P., Purpura D. P., Electroencephal. a. Clin. Neurophysiol. **3**, 225, 1951.
3. Eccles J. C., Physiology of nerve cells. Baltimore, 1957.
4. Бериташвили И. С., Об образной психонервной деятельности животных, III Сеченовское чтение, М., 1966.
5. Беритов И. С., Нервные механизмы поведения высших позвоночных животных, М., 1961.
6. Lorente de Nó R., In: Macromolecular specificity and biological memory. Cambridge (USA), 1962, p. 89.
7. Браше Ж., Современные проблемы цитологии, М., 1955.
8. Caspersson T., Cell growth and cell function. New York, 1959.
9. Бернет Ф., Целостность организма и иммунитет, М., 1964.
10. Naurovitz F., Nature **205**, 847, 1965.
11. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, Киев, 1965.
12. Палладин А. В., Белик Я. В., Крачко Л. С., ДАН СССР **127**, 702, 1959.
13. Geiger A., Physiol. Rev., **38**, 1, 1958.
14. Waelsch H., Lajtha H., Physiol. Rev., **41**, 734, 1961.
15. Waelsch H., Schweiz. med. Wschr., **93**, 1289, 1963.
16. Крепс Е. М., Палладин А. В., Владимиров Г. Е., Сб.: Мирное использование атомной энергии, т. 12, М., 1958.
17. Vladimirov G. E., Baranov M. N., Pevzner L. Z., Tsyn-Yan W., In: Regional Neurochemistry (Eds. S. S. Kety a. J. Elkes). New York, 1961, p. 126.
18. Владимиров Г. Е., Гарские беседы, т. 2, стр. 345, Тбилиси, 1956.
19. Geiger A., Yamasaki S., Lyons R., Am. J. Physiol. **184**, 239, 1956.
20. Эдилашвили Л., Печатается в Сообщ. Акад. Наук Груз. ССР.
21. Певзнер Л. З., Укр. биох. журн., **35**, 448, 1963.
22. Хиден Х., Сб.: Функциональная морфология клетки (Ред. М. Н. Мейсель), М., стр. 185, 1963.
23. Hyden H., In: Neurochemistry (Eds. Elliot K., Page J., Quastel J.), 1955, p. 204.
24. Hyden H., In: Symposium of RNA and the brain. California Univ. Press, 1963.
25. Hyden H., Egyhazi E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **48**, 1366, 1962.
26. Hebb D. O., The organization of behaviour. A neuropsychological theory. New York, 1949.
27. Бериташвили И. С., Реф. докл. на пленарн. заседании X съезда физиол. о-ва. Ереван, 1964. См. также рукопись: Память животных, ее характеристика и происхождение.

28. Talwar G. P., Chopra S. R., Goel B. K., Monte B. D., J. Neurochem. **13**, 109, 1966.
29. Landayer Th. K., Psychol. Rev., **71**, 167, 1964.
30. Galambos R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **47**, 129, 1961.
31. Galambos R., In: Macromolecular specificity and biological memory. (Ed. Schmitt F. O.), Cambridge (USA), 1962, p. 52.
32. Hyden H., In: IV Internat. Congress of Biochemistry, v. 3. Biochemistry of the C.N.S. (Ed. Brücke T.), 1959, p. 64.
33. Hyden H., In: Macromolecular specificity and biological memory. Cambridge (USA), 1962, p. 55.
34. Hyden H., Pigon A., J. Neurochem. **6**, 57, 1960.
35. Egyhazi E., Hyden H., J. Biophys. Biochem. Cytol. **10**, 403, 1961.
36. Taylor D., Nature **180**, 1389, 1917.
37. Рыжков В. Л., Биологическая память и нуклеиновые кислоты. Изв. АН СССР, сер. биол. **4**, 533, 1965.
38. Dingman W., Sporn M. B., J. Psychiat. Res. **1**, 1, 1961.
39. Chamberlain T. Y., Rotschild G. H., Gerard R. W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **49**, 918, 1963.
40. Reich E., Franklin R. M., Shaten A. J., Tatum E. L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **48**, 1238, 1962.
41. Jermolinsky M., De la Haba G. L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **45**, 1721, 1959.
42. Barondes S. H., Jarvik M. E., J. Neurochem. **11**, 187, 1962.
43. Cohen H. D., Barondes S. H., J. Neurochem. **13**, 207, 1966.
44. Flexner L. B., Flexner J. B., Steller E., Exper. Neurobiol. **13**, 264, 1965.
45. Barondes S. H., Nature **205**, 18, 1965.
46. Меерсон З., Кругликов Р. И., Коломейцева И. А., Бюлл. эксп. биол. и мед. **60**, 3, 1965.
47. Крылов О. А., Данилова Р. А., Тонгур В. С., Журн. высш. нервн. деят. **15**, 79, 1965.
48. Flexner J. B., Flexner L. B., Steller E., De la Haba G., Roberts R. B., J. Neurochem. **9**, 525, 1962.
49. Flexner J. B., Flexner L. B., Stellar E., Science **142**, 57, 1963.
50. Flexner L. B., Flexner J. B., De la Haba G., Roberts R. B., J. Neurochem. **12**, 535, 1965.
51. Крылов О. А., Тонгур В. С., Данилова Р. А., Усп. совр. биол. **69**, 336, 1965.
52. Corning W. C., John E. R., Science **134**, 1363, 1961.
53. John E. R., Q., Ann. Rev. Physiol. **23**, 451, 1961.
54. Cook L., Davidson A. B., Davis D. J., Green H., Fellows E. J., Science **141**, 268, 1963.
55. Экклс Дж., Физиология синапсов, М., 1966.
56. Gray E. G., Electron microscopy in anatomy. London, 1961, p. 54.
57. Шестранд Ф., Сб.: Функциональная морфология клетки (Ред. М. Н. Мейсль), М., стр. 69, 1963.
58. Грин Д. Е., Сб.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы (Ред. А. Е. Браунштейн), М., стр. 260, 1964.
59. Green D. E., Israel J. Med. Sci. **1**, 1187, 1965.
60. Novikoff A. B., VII Intern. Biochem. Congress in New York, 1964. Symp. 1, S. 4. Molecular basis of membrane structure and function.
61. Whittam R., VII Intern. Congress Biochem. 1964. VIII, S. 5, Symp. I. Molecular basis of membrane structure and function.
62. Whittaker V. P., In: Methods of separation of subcellular structural component. (Ed. Grant J. K.). Cambridge, 1963, p. 109.
63. Whittaker, Sheridan M. N., J. Neurochem. **12**, 363, 1965.
64. De Robertis E., Arnaiz G., de Lores R., Salganikoff L., de Iraldi A. P., Zieher L. M., J. Neurochem. **10**, 225, 1963.

65. Whittaker W. P., In: Progress in Brain Research, vol. 8. Biogenic amines. Eds. Himwich H. E., Himwich W. A., 1964, p. 90.
66. Curtis D. R., In: The regional chemistry, physiology and pharmacology of the nervous system. (Ed. Kety S.), p. 403, 1961.
67. Costa E., Brodic B. B., In: Progr. in Brain Research, vol. 8. Biogenic amines (Eds. Himwich H. E., Himwich W. A.), 1964, p. 168.
68. Гоциридзе Е. Г., III. Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, Ереван, стр. 393, 1963.
69. Кометиани З. П., Печатается в Сообщ. АН Груз. ССР.
70. Dingman W., Sporn M. B., Science **144**, 26, 1964.
71. Hechter O., Halkerston J. D. K., Perspectives in biology and medicine **7**, 183, 1964.
72. Litwack G. (Ed.). Actions of hormones in molecular processes. New York, 1964.
73. Энгельгардт В. А., Доклад на пленарн. заседании, 9 Менделеев. съезд, Киев, 1965.
74. Klaine L. M., Chi Y. M., Freidberg S. L., Roll T. W., Sutherland E. W., J. Biol. Chem. **237**, 1239, 1962.
75. Hyden H., Lange P. W., Proc. Nat. Acad. Sci. **53**, 946, 1965.
76. Hyden H., In: Symposium of RNA and the brain. California Univ. Press, 1963.
77. Шмитт Ф., Сб.: Горизонты биохимии, посвящ. А. Сент-Дьёрдьи (Ред. М. Каша и Б. Пульман), М., стр. 338, 1964.
78. Schmitt F. O., In: Macromolecular specificity and biological memory. (Ed. Schmitt F. O.), Cambridge (USA), 1962, p. 1.
79. Morrel F., In: Macromolecular specificity and biological memory. (Ed. Schmitt F. O.), Cambridge (USA), 1962, p. 73.
80. Моррел Ф., Сб.: Концепция информации и биологические системы (Ред. В. Фильдс и В. Абботт), М., стр. 179, 1966.
81. Briggs M. H., Barrie G., Psychol. Rev. **69**, 537, 1962.
82. Smith C. E., Science **138**, 889, 1962.
83. Gaito J., Physiol. Rev. **70**, 471, 1963.
84. Sutherland E. W., Harvey Lect., 1961—1962, ser. 57.
85. Mandel L. R., Borek E., Biochemistry **2**, 555, 1963.
86. Landauer Th. K., Psychol. Rev. **71**, 164, 1964.
87. Goldberger A. L., Science **144**, 1529, 1964.
88. Barondes S. H., Nature **205**, 18, 1965.
89. Krech D., Rosenzweig M. R., Bennett E. L., J. Comp. Physiol. Psychol. **53**, 509, 1960.
90. Krech D., Rosenzweig M. R., Bennett E. L., J. comp. Physiol. Psychol. **55**, 801, 1962.
91. Rosenzweig M. R., Krech D., Bennett E. L., Diamond M. C., J. Comp. Physiol. Psychol. **55**, 429, 1962.
92. Deutch J. A., Hamburg M. D., Dahl H., Science **151**, 221, 1966.
93. Алексидзе Н. Г., Неопубликованная работа.
94. Roberts E., Brain Research **2**, 117, 1966.



**ДОКЛАДЫ НА СЕКЦИОННЫХ  
ЗАСЕДАНИЯХ**

## ДЕАМИНИРОВАНИЕ НИКОТИНАМИД-АДЕНИН-ДИНУКЛЕОТИДОВ В МОЗГОВОЙ ТКАНИ И ИХ РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ СВОБОДНОГО АММИАКА

Г. Х. Бунятян и С. Г. Мовсесян

Институт биохимии Академии наук Армянской ССР, Ереван

Впервые Нейбауэр (1) и Кнооп (2) представили экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что аминокислоты подвергаются окислительному деаминированию с образованием свободного аммиака и соответствующих кетокилот, что нашло подтверждение в исследованиях Эмбдена (3) и ряда других авторов. В 1932—35 гг. Кребс установил, что в гомогенатах почек и печени аминокислоты подвергаются окислительному деаминированию, и выделил ферменты, катализирующие этот процесс (4—6); оказалось, что D-аминокислоты деаминируются в 10—26 раз энергичнее, чем соответствующие природные L-аминокислоты.

Исследования Блэнчерда и сотр. с высоко очищенным флавиновым ферментом, выделенным из почек крыс — L-аминокислотной оксидазой, показали, что она не действует на глицин и на L-аминокислоты: серин, треонин, аспарагиновую (АК)\* и глутаминовую (ГК) кислоты, орнитин, лизин и аргинин (7). Низкая активность L-аминокислотной оксидазы, ее оптимальное действие при высоких значениях рН и отсутствие рацемазной активности в тканях млекопитающих не позволяют объяснить образование свободного аммиака из аминокислот.

В мозговой ткани, где происходит интенсивное образование аммиака, L-аминокислотная оксидаза отсутствует.

В 1937 г. Браунштейн и Крицман открыли процесс трансминирования (8), в том же году и в дальнейшем Эйлер и сотр.

---

\* В данной статье имеются следующие дополнительные сокращения: АК — аспарагиновая кислота; ГК — глутаминовая кислота; НАД-аза — НАД-нуклеозидаза; НМН — никотинамидмононуклеотид; Д-НАД — деамино-НАД; Н — никотинамид.

изучая дегидрирование ГК, выделили из различных источников фермент, специфически деаминирующий L-ГК (9—12). На основании этих данных Браунштейн выдвинул механизм образования свободного аммиака из аминокислот через трансдеаминирование (8). Однако, как показали работы Эйлера и сотр. (10), а затем многих других исследователей, дегидрогеназа ГК при физиологических значениях рН значительно сильнее ускоряет синтез ГК из  $\alpha$ -кетоглутарата и аммиака, чем ее окислительное деаминирование (13—16). Таким образом, не представляется возможным объяснить образование свободного аммиака из аминокислот через трансдеаминирование, особенно в мозговой ткани, которая обладает слабой глутамат-дегидрогеназной активностью.

Следует отметить, что 80—90% утилизированной ГК превращается в АК, как это было установлено многими авторами в отношении печени (17—20), мышечной (18, 20) и мозговой ткани (19, 21—24), т. е. значительная часть аминного азота аминокислот через ГК включается в АК. Последняя играет важную роль в конечных превращениях аминного азота. Через АК он включается в мочевины, пуриновые и пиримидиновые соединения. Представляет значительный интерес выяснение роли АК и в образовании свободного аммиака из аминокислот.

В нашей лаборатории Мовсесян установил, что НАД и НАДФ в гомогенатах и митохондриальной фракции мозговой ткани подвергаются деаминированию, выделяя значительные количества аммиака (25). На основании ряда данных мы пришли к выводу, что НАД и НАДФ выделяют аммиак из остатка аденина и превращаются в свои деамино-формы.

В связи с полученными результатами мы задались целью изучить процессы реаминирования Д-НАД с участием АК, ГК и ГАМК, имея в виду, что ИМФ реаминируется в адениловую через образование аденилосукцината из ИМФ и АК.

Из ферментов, расщепляющих НАД в мозговой ткани, особенно активна НАД-нуклеозидаза (НАД-аза), катализирующая распад НАД на АДФР и никотинамид (26—29). Этот фермент сосредоточен в микросомах, и активность его почти полностью подавляется добавленным никотинамидом (26—30).

НАД-пирофосфатаза, расщепляющая НАД на АМФ и ИМН, отсутствует в мозговой ткани (28, 29). Об этом свидетельствуют и наши исследования (31). НАД-деаминаза, расщепляющая НАД на деамидо-НАД и аммиак, согласно нашим данным, отсутствует в мозговой ткани. Как указывалось выше, особенно активна в мозговой ткани НАД-деаминаза (25, 31). Интересно отметить, что в исследованиях Мунца НАД, добавленный к экстрактам мозговой ткани, значительно повышал продуцирование аммиака (32).



## Методика и результаты исследования

Исследования проводили на белых крысах. Животных декапитировали, быстро извлекали мозг и переносили его в охлажденный стакан. После удаления мозговых оболочек измельчали мозг ножницами и гомогенизировали его в 9 объемах 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4) в ручном гомогенизаторе, сконструированном по модели Даунса. Гомогенат центрифугировали на холоду (0—4°) для удаления ядер при 800—900 g 10 минут. Фракцию митохондрий отделяли путем центрифугирования надосадочной жидкости в течение 15—20 минут при 18 000—20 000 g. На каждую пробу брали такое количество митохондрий, которое соответствует 500 мг свежей ткани (3,9—4,9 мг митохондриального белка). Инкубационная смесь содержала: 0,1 мл 0,133 М К-фосфатного буфера (рН 7,4), 0,15 мл 0,2 М Трис-НСI буфера (рН 7,45), 0,1 мл 0,12 М MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мл митохондриальной фракции. Объем жидкости доводили до 1,5 мл добавлением 0,25 М сахарозы (рН 7,4). На каждую пробу брали в мкмольях: НАД, НАД-Н<sub>2</sub> — 2,86; никотинамида — 8,2; АТФ — 1,0; АМФ — 2,8; ГТФ — 1,0; ИМФ — 2,8 и деамино-НАД — 1,43; АК, ГК и ГАМК добавляли на пробу по 0,1 мл 0,26 М их раствора. Инкубацию проводили при 37°С в течение одного часа в атмосфере воздуха.

Аммиак определяли микрометодом Селигсона в модификации Силаковой и сотр. (33). Белок определяли по методу Лоури и сотр. (34); НАД определяли спектрофотометрически (СФ-4) при E 265 nm; фосфор — по Фiske и Суббароу (35). НАД, НАД-Н<sub>2</sub>, АТФ, АМФ, ГТФ, ИМФ и деамино-НАД были получены от Sigma Chemical Company.

В первую очередь нас интересовал вопрос образования аммиака при добавлении вместе с НАД АК, ГАМК и ГК, т. е. тех аминокислот, в которые наиболее интенсивно включается аминоксизот. Параллельно ставили опыты с АМФ. Хотя НАД-аза сосредоточена в микросомальной фракции, тем не менее мы в опытах с НАД добавляли и никотинамид (Н), сильно тормозящий активность НАД-азы.

Результаты исследований, приведенные в таблице 1, показывают, что при добавлении эквимольных количеств НАД и АМФ образуется такое же количество аммиака.

Таблица 1  
Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении НАД, АК и ГАМК

	Условия опыта							
	АК	ГАМК	НАД + Н	НАД + Н	НАД + Н	АМФ	АМФ + АК	АМФ + НАД + Н
Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)	0,7 *(8)	0,17 (4)	3,81 (7)	АК 6,1 (9)	ГАМК 6,1 (5)	3,92 (6)	4,42 (7)	5,0 (4)

\* В скобках число опытов.

Определение НАД спектрофотометрическим путем показало, что его содержание после инкубации понижается на 40%. АК и особенно ГАМК лишь несколько повышают прирост аммиака, но добавленные вместе с НАД они значительно стимулируют образование аммиака. Как видно из табл. 1, при прибавлении АК вместе с АМФ, прирост аммиака даже меньше, чем суммарное повышение содержания аммиака в опытах с одним АМФ и АК. Подобное явление отмечается и при добавлении АМФ и НАД вместе; прирост аммиака в этом случае составляет 5,0 мкг/мг белка, между тем как добавка одного НАД повышала уровень аммиака на 3,81, а АМФ — на 3,92 мкг/мг белка. Подобное явление отмечалось нами в опытах с добавлением АТФ и АТФ вместе с НАД.

Результаты исследований, проведенных с НАД и ГК, приведены в табл. 2. Они свидетельствуют о том, что ГК понижает уровень аммиака, но добавленная вместе с НАД, значительно повышает прирост аммиака — на 2,28 мкг/мг белка. Следует отметить, что при добавлении ГК значительное количество аммиака аккумулируется в глутамине. Как показали наши исследования, этот процесс особенно усиливается в присутствии АТФ. Как видно из табл. 2, никотинамид на содержание аммиака особого влияния не оказывает.

Таблица 2

Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении НАД и ГК

	Условия опыта			
	ГК	НАД + Н	НАД + Н + ГК	Н
Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)	-0,37 (11)	3,65 (14)	5,56 (11)	0,27 (5)

Результаты исследований, проведенных с НАД-Н<sub>2</sub>, показывают (табл. 3), что он вызывает значительный прирост аммиака (5,07 мкг/мг/белка) по сравнению с инкубированным контролем. Образование аммиака повышается еще больше, когда вместе с НАД-Н<sub>2</sub> добавляются ГК и ГАМК. Полученные результаты позволяют заключить, что повышенный прирост аммиака при добавлении НАД и ГК (табл. 2) не обусловливается окислительным деаминированием ГК; как видно из таблицы 3, в опытах с НАД-Н<sub>2</sub> и ГК образуется даже больше аммиака, чем в пробах, где добавлялись НАД и ГК.

Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении НАД-Н, ГК и ГАМК

Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)	Условия опыта				
	ГК	ГАМК	НАДН <sub>2</sub> +Н	НАДН <sub>2</sub> +Н +	НАДН <sub>2</sub> +Н +
	—0.55 (4)	0.97 (4)	5.07 (9)	ГК 7.02 (9)	ГАМК 7.21 (9)

Таким образом, НАД и НАД-Н<sub>2</sub> являются эффективными источниками свободного аммиака в митохондриальной фракции мозга, а АК, ГК и ГАМК, добавленные вместе с НАД и НАД-Н<sub>2</sub>, значительно повышают прирост аммиака. Можно думать, что НАД (НАД-Н<sub>2</sub>), подвергаясь деаминированию за счет остатка аденина, переходит в деамино-НАД (Д-НАД), последний реагируется вышеуказанными аминокислотами с образованием НАД-сукцината, который превращается в НАД и фумарат, а НАД вновь подвергается деаминированию, т. е. происходит процесс, аналогичный образованию АМФ из ИМФ и АК (ИМФ + АК → аденилосукцинат → АМФ + фумарат). В связи с этим представляет интерес изучение образования аммиака при добавлении Д-НАД вместе с АК, ГК и ГАМК.

Исследования, проведенные в этом направлении, приведены в табл. 4. Учитывая, что образование аденилосукцината из ИМФ и АК происходит при участии АТФ, а по некоторым данным и с участием ГТФ (36), мы в соответствующих опытах применяли АТФ или ГТФ. Как видно из таблицы 4, Д-НАД, а также Д-НАД и никотинамид не оказывают особого влияния на содержание аммиака. Прирост аммиака заметно повышается при добавлении Д-НАД и АК. АТФ сам по себе является эффективным источником аммиака. Вероятно он превращается в АМФ, а последний деаминируется, хотя не исключена возможность и прямого деаминирования АТФ (37). Некоторый прирост аммиака отмечается в опытах с добавлением АТФ и АК. Значительное повышение содержания аммиака наблюдается в присутствии добавленных вместе Д-НАД, АК и АТФ, оно составляет 7,62 мкг/мг белка.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ГТФ также служит эффективным источником аммиака при инкубировании с митохондриальной фракцией мозговой ткани (табл. 4).



Таблица 4

Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении Д-НАД, АК, АТФ, и ГТФ

	Условия опыта											
Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)	АК	Д-НАД	Д-НАД +	Д-НАД +	АТФ	АТФ +	Д-НАД +	Д-НАД +	ГТФ	ГТФ +	Д-НАД +	Д-НАД +
			Н	Н		АК	Н	Н		АК	Н	Н
				+			+	+			+	+
				АК			АТФ	АТФ			ГТФ	ГТФ
								+				+
								АК				АК
	0,38 (8)	0,5 (4)	0,56 (6)	2,21 (7)	4,09 (10)	5,19 (10)	4,56 (7)	7,62 (8)	4,21 (6)	4,54 (5)	4,34 (6)	5,93 (6)

Возникает вопрос — происходит ли непосредственное деами- нирование ГТФ, или он переходит в ГМФ и аммиак образуется из последнего? Для выяснения этого необходимы соответствующие исследования.

В опытах Мунца (32) ГМФ значительно повышает прирост аммиака в экстрактах ацетонового порошка мозговой ткани. Приведенные в табл. 4 данные показывают, что ГТФ стимули- рует образование аммиака в присутствии добавленных Д-НАД и АК, однако по своему эффекту он заметно уступает АТФ.

Данные, полученные в исследованиях с Д-НАД и ГАМК, при- ведены в табл. 5. Они показывают, что в присутствии добавлен- ных ГАМК и Д-НАД прирост аммиака заметно повышается, хотя и в меньшей степени, чем в опытах с добавлением АК и Д-НАД (табл. 4). Значительно повышение содержания аммиака в пробах с ГАМК, Д-НАД и АТФ, добавленными вместе, однако и в этом случае АК более эффективна, чем ГАМК.

Таблица 5

Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении Д-НАД и ГАМК

	Условия опыта					
	ГАМК	Д-НАД +	Д-НАД +	АТФ	АТФ +	АТФ +
Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)		Н	Н		ГАМК	Д-НАД
			+			+
			ГАМК			Н
						+
						ГАМК
	0,29 (4)	0,56 (6)	1,39 (4)	4,09 (10)	4,75 (4)	6,21 (4)

Исследования, проведенные с ГК и Д-НАД, показали, что при их совместном добавлении прирост аммиака повышается, но опять в меньшей степени, чем в присутствии добавленных АК и Д-НАД. При совместном добавлении ГК, Д-НАД и АТФ образовавшийся аммиак накапливается в глутамине, количество которого точно определить в присутствии НАД или Д-НАД под действием едкого калия было невозможно, т. к. последний вытесняет аммиак также из амидной группы НАД и Д-НАД.

В дальнейших исследованиях мы задались целью выяснить эффективность ИМФ по сравнению с Д-НАД в образовании аммиака при добавлении АК. ИМФ, как известно, реаминируется в АМФ. Этому процессу придают большое значение в образовании свободного аммиака П. А. Кометиани и сотр. (38—40). ИМФ мы добавляли вдвое больше (2,8 мкмоль), чем Д-НАД.

Таблица 6

Содержание аммиака после инкубирования митохондриальной фракции мозга крыс при добавлении ИМФ и АК

Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка	Условия опыта						
	АК	ИМФ	АТФ	АТФ + ИМФ	ИМФ + АК	АТФ + АК	ИМФ + АТФ + АК
(средние данные)	0,31 (6)	-0,07 (6)	3,94 (6)	4,35 (6)	0,88 (6)	5,08 (6)	5,86 (6)

Таблица 7

Содержание аммиака и неорганического фосфора в гомогенатах и экстрактах ацетонового порошка печеночной и почечной ткани крыс при добавлении АМФ и НАД

Условия опыта	Прирост аммиака по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)	Прирост фосфора по сравнению с инкубированным контролем в мкг/мг белка (средние данные)
---------------	---	---

Гомогенаты (печень)

АМФ	7,3 (5)	27,5 (4)
НАД	5,1 (8)	24,1 (4)

Экстракты ацетонового порошка (печень)

АМФ	4,9 (6)	10,7 (7)
НАД	5,2 (6)	6,6 (7)

Гомогенаты (почка)

АМФ	4,9 (6)	25,3 (4)
НАД	4,8 (8)	21,3 (4)

Экстракты ацетонового порошка (почка)

АМФ	6,8 (6)	8,3 (6)
НАД	4,4 (8)	5,6 (6)



Результаты исследований, проведенные в этом направлении (табл. 6) показывают, что при добавлении ИМФ и АК прирост аммиака заметно ниже, чем в присутствии добавленных Д-НАД и АК. Эта разница более значительна в опытах с совместным добавлением АК, ИМФ и АТФ. Так, например, в присутствии добавленных АТФ и АК прирост аммиака составляет 5,08 мкг, а когда с АТФ и АК добавляется ИМФ, он повышается до 5,86 мкг на мг белка. Таким образом, ИМФ добавленный даже в двойном количестве, в образовании свободного аммиака несравненно менее эффективен, чем Д-НАД.

Исследования с гомогенатом и экстрактом ацетонового порошка печени и почек, проведенные в нашей лаборатории Манасян, показали, что АМФ и НАД сильно повышают прирост аммиака в гомогенатах печени. Параллельно с приростом аммиака значительно возрастает уровень фосфата, что обусловливается нуклеотидазной и НАД-пирофосфатазной активностью печеночной ткани (табл. 7). Интересно отметить, что в экстрактах ацетонового порошка деаминирование АМФ значительно понижается, между тем как деаминирование НАД сохраняется на прежнем уровне, при этом прирост фосфата в опытах с АМФ, и особенно с НАД, резко понижается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что образование аммиака из НАД и в печени может обуславливаться его прямым деаминированием. Несмотря на то, что НАД-пирофосфатазная и НАД-азная активности в экстрактах ацетонового порошка печеночной ткани значительно снижаются, тем не менее аммиак из НАД образуется в том же количестве.

Как видно из таблицы 7, в гомогенатах почек также происходит усиленное, почти одинаковое образование аммиака из АМФ и НАД, которое сопровождается значительным приростом фосфата. В экстрактах ацетонового порошка деаминирование НАД сохраняется на том же уровне, что и в гомогенатах, между тем как продуцирование аммиака из АМФ повышается. Полученные данные как в отношении печеночной, так и почечной ткани свидетельствуют о том, что АМФ и НАД деаминируются различными деаминазами. Об этом свидетельствует и ряд данных, полученных нами в отношении мозговой ткани. Так, например, сукцинат резко тормозит выделение аммиака из НАД в митохондриальной фракции мозга и в меньшей степени оказывает влияние на деаминирование АМФ. Кроме того, АТФ активирует деаминирование АМФ и не влияет на выделение аммиака из НАД, что отмечалось и в исследованиях Мунца (32).

Данные, полученные с ацетоновым порошком в отношении изменения уровня фосфата, указывают на возможность также прямого деаминирования НАД в почечной ткани.

## Заключение

Установленные нами факты свидетельствуют о прямом деаминировании никотинамид-аденин-динуклеотидов в мозговой ткани. При торможении НАД-азы никотинамидом, продуцирование аммиака из НАД осуществляется без прироста фосфата. С другой стороны, НАД по нашим данным в мозговой ткани не деамидируется. Отсутствие прироста фосфата при деаминировании НАД в митохондриальной фракции и повышение уровня фосфата при деаминировании АМФ исключают превращение НАД пироглутаматом в АМФ. Кроме того, пироглутаматаз сосредоточена в ядрах (41—44). Таким образом, в мозговой ткани НАД за счет остатка аденина переходит в Д-НАД. Эта реакция представляет существенный интерес во многих процессах, например, в окислительно-восстановительных, в том числе в транспорте электронов и образовании промежуточных макроэргов в митохондриях, при гликолизе и т. д.

Исследования, проведенные нами (45), показали, что в процессе гликолиза в мозговой ткани при добавлении Д-НАД, образование молочной кислоты угнетается, в среде накапливается пируват и  $\alpha$ -кетоглутарат; обратная картина наблюдается в присутствии добавленного НАД (45).

Значительный интерес представляет реаминирование Д-НАД и выяснение значения этого процесса в образовании свободного аммиака из аминокислот. Проведенные нами исследования показывают, что в присутствии добавленных НАД и АК, ГК или ГАМК выход аммиака значительно возрастает, при добавлении Д-НАД и этих аминокислот продуцирование аммиака также протекает энергично, особенно с АК. По-видимому, ГК и ГАМК участвуют в реаминировании Д-НАД путем повышения содержания АК. Продуцирование аммиака в присутствии Д-НАД и АК, как и в случае ИМФ и АК, усиливается АТФ. Предварительные данные, полученные нами, свидетельствуют о возможности прямого деаминирования НАД в печени и почках. В отношении реаминирования Д-НАД в этих органах интерес представляют исследования Каплана и сотр. (46), показавших, что при введении мышам Д-НАД значительно повышается содержание НАД, особенно в печени и почках. Интересно отметить, что уровень НАД в этих органах повышается в меньшей степени после введения самого НАД.

На основании полученных нами результатов можно предложить следующий механизм образования аммиака из аминокислот (рис. 1).

Исследования, проведенные нами с АМФ и АК, ИМФ и АК, показывают, что предлагаемый механизм более эффективен, чем продуцирование аммиака путем образования из ИМФ и АК аденилосукцината, из последнего — АМФ и фумарата и последую-

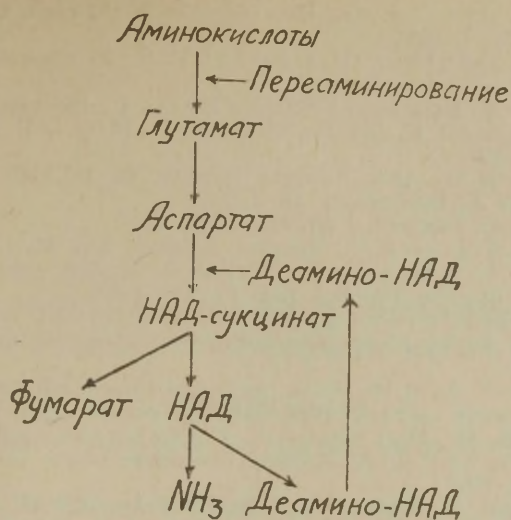


Рис. 1. Механизм образования аммиака из аминокислот.

щего деаминирования АМФ. Следует учесть также, что уровень АМФ и ИМФ в мозговой ткани незначителен по сравнению с НАД и НАД-Н<sub>2</sub>, содержание которых составляет 22—30 мг% (46-48) и значительно больше в печени и сердечной мышце. Кроме того, образование АК из ГК, аденилосукцината из АК и ИМФ происходит в аэробных условиях, при которых АМФ интенсивно превращается в АТФ, необходимый для синтеза самого аденилосукцината.

Результаты наших исследований позволяют заключить, что НАД и НАД-Н<sub>2</sub>, помимо их участия в окислительно-восстановительных процессах, несут и другие функции.

Интересно отметить, что в митохондриях не все количество НАД участвует в дыхательной цепи. Например, интактные митохондрии печени крыс содержат от 30 до 40 моль НАД на 1 моль цитохрома *a* (49).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Neubauer O., Deut. Arch. Klin. Med. **31**, 211, 1909.
2. Knoор F., Z. physiol. Chem. **67**, 489, 1910; **71**, 252, 1911.
3. Embden G., Schmitz E., Biochem. Z. **29**, 42, 3, 1910; **38**, 393, 1912.
4. Krebs H. A., Klin. Wochschr. **II**, 1744, 1932.
5. Krebs H. A., Z. physiol. Chem. **217**, 191, 1933; **218**, 157, 1933.
6. Krebs H. A., Biochem. J. **29**, 1620, 1935.
7. Blanchard M., Green D. E., Nocito V., Ratner S., J. Biol. Chem. **155**, 421, 1944; **161**, 583, 1945.
8. Браунштейн А. Е., Биохимия аминокислотного обмена, М., 1949.
9. Euler H. V., Adler E., Steenhof-Erickson T., Z. physiol. Chem. **248**, 227, 1937.
10. Euler H. V., Adler E., Günther G., Das N. B., Z. physiol. Chem. **254**, 61, 1938.



11. Adler E., Günther G., Hellstorm V., Euler H. V., *Z. physiol. Chem.* **255**, 14, 1938.
12. Adler E., Günther G., Everett J. E., *Z. physiol. Chem.*, **255**, 27, 1938.
13. Krebs H. A., Eggleston L. V., Hems R., *Biochem. J.* **43**, 406, 1948.
14. Copenhaver J. H., Jr., McShan W. H., Meyer R. K., *J. Biol. Chem.* **183**, 73, 1950.
15. Strecker H. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 127, 140, 1953.
16. Holton F. A., *Biochem. J.* **58**, 1, 1954.
17. Krebs H. A., *Biochem. J.* **47**, 605, 1950.
18. Borst P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 170, 1960.
19. Krebs H. A., Bellamy D., *Biochem. J.* **75**, 523, 1960.
20. Borst P., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 256, 1962.
21. Haslam B. J., Krebs H. A., *Biochem. J.* **88**, 566, 1963.
22. Бунятян Г. Х., *Журн. Всесоюзн. хим. общества им. Менделеева* **9**, 412, 1964.
23. Бунятян Г. Х., в сб.: Роль гамма-аминомасляной кислоты в деятельности нервной системы. Изд. Ленингр. университета, стр. 9, 1964.
24. Демин Ю. М., Мусаелян С. С., Карапетян В. С., Осипова Э. Н., Акопян Д. А., *Вопросы биохимии мозга. Изд. АН Арм ССР*, вып. I, 4, 1964.
25. Мовсесян С. Г., Бунятян Г. Х., *ДАН АрмССР* **41**, 159, 1965.
26. Mann P. J. G., Quastel J. H., *Biochem. J.* **35**, 502, 1941.
27. Handler P., Klein J. R., *J. Biol. Chem.* **143**, 49, 1942.
28. Kornberg A., Lindberg O., *J. Biol. Chem.* **176**, 665, 1948.
29. Jacobson K. B., Kaplan N. O., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 31, 1951.
30. Larner J., Jandorf B. J., Summerson W. H., *J. Biol. Chem.* **178**, 373, 1949.
31. Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г. *Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР*, вып. 2, 5, 1966.
32. Muntz J. A., *J. Biol. Chem.* **201**, 221, 1953.
33. Силакова А. И., Труш Г. П., Явлиякова А., *Вопр. мед. хим.* **8**, 538, 1962.
34. Lowry O. H., Rosebrough N. T., Farr A. L., Randal R. T., *J. Biol. Chem.* **200**, 197, 1953.
35. Fiske C. H., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
36. Lieberman J., *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 251, 1956; *J. Biol. Chem.* **233**, 327, 1956.
37. Бунятян Г. Х., Друтюнян А. В., *Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР*, вып. 2, 23, 1966.
38. Кометиани П. А., *Биохимия* **24**, 729, 1955.
39. Кометиани П. А., Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвалия Н. В., Чикваидзе В. Н., *Вопросы биохимии нервной и мышечной системы*, Тбилиси, стр. 42, 1965.
40. Кометиани П. А., *Укр. биохим. ж.* **37**, 721, 1965.
41. Hogeboom G. H., Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **197**, 611, 1952.
42. Branster M. V., Morton R. K., *Biochem. J.* **63**, 640, 1956.
43. Atkinson M. R., Jackson J. F., Morton R. K., *Biochem. J.* **80**, 318, 1961.
44. Северин С. Е., Цейтлин Л. А., Телепнева В. И., *ДАН СССР* **164**, 953, 1965.
45. Урганджян М. Г., Мовсесян С. Г., *Вопросы биохимии мозга. Изд. АН АрмССР*, вып. 2, 1966.
46. Kaplan N. O., Goldin A., Humphreys S. R., Ciotti M. M., Stolzenbach F. S., *J. Biol. Chem.* **219**, 287, 1956.
47. Glock G. E., McLean P., *Biochem. J.* **61**, 388, 1955.
48. Minard G. E., Chae Hee Hahn, *J. Biol. Chem.* **238**, 2471, 1963.
49. Lehninger A. L., Wadkins Ch. L., Cooper C., Devlin T. M., Gamble J. L., Jr. *Science* **128**, 450, 1958.

## О РОЛИ ОБРАТИМОГО АМИДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ОБМЕНЕ И ФУНКЦИЯХ МОЗГА

Л. Я. Тяхепыльд

Кафедра биохимии Тартуского государственного университета, Тарту

Среди многочисленных обменных процессов, протекающих в метаболическом котле нервной ткани, одной из наиболее близко поставленных химических реакций к функциональному состоянию ЦНС является, несомненно, образование и устранение аммиака.

Положение об аммиаке как о тонком биохимическом показателе функционального состояния нервной системы, выдвинутое Е. А. Владимировой еще в 1954 г. (1), нашло до настоящего времени известное подтверждение и дальнейшее развитие для самых различных функциональных состояний, развивающихся под действием целого ряда факторов внешней и внутренней среды (см. обзоры 2—6 и др.). Строго функциональное значение аммиака для нервной деятельности подтверждается также его выраженным токсическим влиянием, на что впервые указали в своих классических исследованиях И. П. Павлов и М. В. Ненцкий (7) и что затем нашло свое многостороннее подтверждение (8—10).

Поэтому понятен тот интерес, который уделяется выяснению источников и механизмов образования и связывания аммиака, что нашло свое отражение на всех Всесоюзных конференциях по биохимии нервной системы, а также на других нейробиохимических симпозиумах.

К настоящему времени многочисленные опыты как *in vivo*, так и *in vitro* выявили, что в низкомолекулярной фракции нервной ткани в метаболизме аммиака существенная роль принадлежит системе дикарбоновых аминокислот, в частности системе glutaminовой кислоты, имеющей наибольшее число перекрестных связей на пути азотистого обмена (2, 3, 5).

По исследованиям лаборатории А. В. Палладина (2) и П. А. Кометиани (3), определенное значение в этих процессах имеет

также адениловая система, связывающая обмен аммиака с нуклеиновыми кислотами, и, по данным лаборатории Г. Х. Бунятян, — с аденидинуклеотидами (12).

Некоторые другие формы, источники и механизмы образования и связывания аммиака в мозгу (гексозамины, орнитиновый цикл, N-ацетиласпарагиновая кислота) выступают в качестве вспомогательных возможностей и, в частности, в тех случаях, когда по тем или иным причинам возможности системы глутаминовой кислоты исчерпаны.

Вместе с тем на сегодняшний день совершенно очевидно, что универсальные процессы образования аммиака, а также механизмы его связывания не могут быть полностью объяснены только в системе низкомолекулярных азотистых веществ в метаболическом фонде ткани мозга. Таким же образом механизмы токсического действия аммиака, очевидно, не исчерпываются нарушением тех или иных метаболических звеньев в низкомолекулярной фракции нервной ткани. Учитывая тесную генетическую связь аммиака с белками, что имеет древнюю эволюционную основу, возник вопрос об участии белков мозга со своими функционально-лабильными амидными группами в обмене аммиака.

Возможность участия амидных групп белков мозга в образовании и связывании аммиака была допущена еще в 1950 году Вейл-Малербом (13) и Е. А. Владимировой (14). Такой механизм освобождения и устранения аммиака был установлен в мышечной ткани Д. Л. Фердманом и С. Ф. Эпштейном (15). Однако первые экспериментальные доказательства в пользу участия амидных групп белков мозга в процессах образования и связывания аммиака были представлены в работах Р. Врба в 1955 г. (16).

На основании собственных экспериментальных фактов и имеющихся литературных данных Врба приходит к заключению, что функциональная активность (возбуждение) и отдых (торможение) нервной системы представляют собой с биохимической точки зрения циклический процесс деградации и ресинтеза белков нервной ткани. Конечным продуктом деградации является аммиак, в обезвреживании которого важную роль играет промежуточная фаза — глутаминовая кислота-глутамин, которая в свою очередь является исходным звеном для ресинтеза белков. Таким образом, в сформулированной Р. Врба (17) гипотезе циклических процессов азотистого обмена в мозгу, являющихся единым для состояния возбуждения и торможения, ставится определенно вопрос об участии белков в обмене аммиака мозга.

Хотя гипотеза Врба отрицает участие других источников аммиакообразования, в частности глутамина и адениловой системы, тем не менее эти его работы побудили к дальнейшим



исследованиям роли белков в обмене аммиака и функциях мозга.

Действительно, дальнейшие работы *in vitro* на срезах (18—20) и гомогенатах (21—24) подтвердили образование аммиака за счет амидных групп белков.

Подробные исследования различных источников образования аммиака, в том числе и амидных групп белков, проведены в лаборатории П. А. Кометиани (3). В этих исследованиях весьма существенным следует считать факт, что направленность образования аммиака и удельный вес отдельных источников зависит от целостности структуры инкубируемых препаратов ткани мозга, а также от условий инкубации.

Однако наибольшее значение имеют амидные группы белков, азот которых вовлекается в обменные процессы как в аминокислотном котле, так и в адениловой системе. Поскольку различные белки мозга обладают разной степенью амидированности (22—24), большое значение приобретают исследования Е. Э. Клейн (25) об участии различных фракций белков в процессе аммиакообразования. С другой стороны, прибавление к инкубационной среде ионов аммония приводит к их связыванию белками мозга (5,6).

Таким образом, эти результаты, полученные *in vitro*, явно свидетельствуют о важной роли амидных групп белков в обмене аммиака.

Исследования нашей лаборатории, начатые в 1958 г. под руководством покойного проф. Э. Э. Мартинсона, были направлены прежде всего на выявление реального существования прижизненного и обратимого амидирования белков мозга в обмене аммиака при различных функциональных состояниях. Было показано, что в условиях экспериментального накопления аммиака как при его введении извне (26), так и при поражении печени (27) связывание аммиака происходит действительно не только в системе глютаминовой кислоты, но и белками мозга за счет их амидирования. Белки мозга участвуют в связывании аммиака также при длительном медикаментозном сне (27).

Наоборот, при электрическом раздражении (28) и при гипогликемических судорогах, вызванных введением больших доз инсулина (29), в опытах *in vivo* было доказано образование аммиака за счет дезамидирования. Таким образом, эти работы подтвердили реальное прижизненное участие амидных групп белков в метаболизме аммиака в зависимости от функционального состояния ЦНС.

Следует подчеркнуть, что при электрическом раздражении в зависимости от длительности возбуждения был установлен обратимый характер амидирования белков в связи с переходом первоначального возбуждения в состояние угнетения (28). Реактивность амидных групп белков мозга в обмене аммиака *in vivo*

была подтверждена в систематических исследованиях лаборатории З. С. Гершеневича и его сотр. при некоторых экстремальных состояниях (22, 30, 31), М. С. Гаевской при умирании и оживлении организма (32), С. Р. Френкеля под действием ряда токсических веществ (33), Б. Г. Гордон при нарушении функции печени под действием  $\text{CCl}_4$  (34) и др. Заслуживает внимания, что участие амидных групп белков мозга в обмене аммиака выявлена даже при условно-рефлекторных воздействиях в опытах Е. А. Владимировой (35).

С другой стороны, вовлечением амидных групп белков мозга в обмен аммиака изменяется соотношение между их амидными и карбоксильными группами. А эти группы, в частности карбоксильные, согласно современным представлениям структуры белков (36), через электрический заряд и возможность образования ковалентных водородных и солевых связей, имеют существенное значение при определении физико-химического и конформационного состояния белков. Таким образом, путем изменения степени амидирования белков мозга происходит не только их включение в азотистый обмен, но и изменение физико-химических свойств и конформационного состояния этих клеточных белков и тем самым, возможно, всей структурной организации клетки, так как она отражает в конечном итоге структуру макромолекул, входящих в ее состав (37). Такое, разумеется, схематическое представление о взаимосвязи структуры и метаболизма в связи с функциональным состоянием соответствует в общем, однако, денатурационной теории возбуждения Д. Н. Насонова. В настоящее время Дж. Унгаром (38) представлены конкретные данные о конформационных изменениях (трансконформации) белков мозга при возбуждении по их дифференциальным УФ-спектрам и изменениям количества сульфгидрильных групп. В свете этих данных обратимое амидирование белков мозга могло бы служить одним из конкретных биохимических механизмов между метаболизмом аммиака и трансконформацией белков.

В наших предыдущих исследованиях при экспериментальном накоплении аммиака в мозгу (26), поражении печени (26), инсулиновой гипогликемии (29) и при введении гормонов щитовидной железы (39) удалось действительно выявить параллельно с направленностью амидирования соответствующие противоположные изменения в электрофоретической подвижности и УФ-спектрах растворимых белков мозга. Естественно, что в этом отношении наиболее убедительными представляются такие экспериментальные условия, при которых имеют место различия в степени амидирования белков, что должно сопровождаться и различными изменениями их физико-химического и конформационного состояния, т. е. обратимость амидирования белков сопровождается обратимостью их физико-химического и конформационного состояния.



Такие данные, полученные в опытах с электрическим раздражением различной продолжительности (28), представлены нами на предыдущей нейрехимической конференции. В настоящем сообщении представляем по этому вопросу ряд новых фактов, установленных в нашей лаборатории за последние годы.

Опыты были поставлены на морских свинках, крысах и кошках. В соответствующем функциональном состоянии эксперимента животные умерщвлялись отсечением головы с немедленным погружением ее в жидкий азот. Замороженный мозг извлекался, растирался в ступке до тонкого порошка и из него брались пробы для определения свободного преформированного аммиака, амидного азота глутамина и амидных групп белков методами, описанными нами ранее (26). Из этого же замороженного порошка мозга приготавливались также экстракты растворимых белков мозга по А. В. Палладину и Н. М. Поляковой (40) для их электрофоретического и спектрофотометрического исследования.

Электрофорез был проведен на бумаге в вертикальной камере типа Дурума при следующих условиях: напряжение тока 300 вольт, сила тока 0,8—1,0 мА на одну ленту, продолжительность 7—11 часов. По электрофореграммам, окрашенным амидочерным 10В, была вычислена электрофоретическая подвижность (ЭП) наиболее быстро движущейся альбуминовой фракции по формуле Грабара и Буртона (41):

$$U = \frac{d}{x \cdot t}, \text{ где}$$

$U$  — ЭП (в  $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{вольт}^{-1}$ ),  $d$  — длина пути фракции в см,  $x$  — градиент потенциала на 1 см ленты ( $\frac{\text{вольт}}{\text{см}}$ ) и  $t$  — продолжительность электрофореза в секундах.

Ультрафиолетовые (УФ) спектры поглощения растворимых белков мозга от контрольных и подопытных животных после выравнивания концентрации белка в экстрактах были определены при 220—320 нм. В ряде серий опытов УФ спектры поглощения белков мозга были выражены по Унгару (38) как «коэффициент ионизации боковых групп» (КИБГ), т. е. как отношение экстинкции при pH 12 к экстинкции при pH 7.

Все полученные данные подвергнуты статистической обработке по  $t$  тесту. Различия оценены достоверными при  $p < 0,05$ .

Были поставлены опыты на морских свинках и кошках с однократным и повторным подкожным введением хлористого аммония. В первом случае хлористый аммоний вводился в дозе 0,6—1,0 г/кг и животные умерщвлялись через 9—45 минут в состоянии явного возбуждения или судорог. Повторное введение хлористого аммония (общее количество 1,2—1,5 г/кг) осуществлялось в 4 приема с получасовыми интервалами. Животные брались на опыт через 2 часа после первого введения в коматозном состоянии.

Оказалось, что как при однократном, так и при повторном введении хлористого аммония в мозг происходит выраженное накопление свободного преформированного аммиака, что в последнем случае выражено в более значительной степени (рис. 1А). В то же время происходит интенсивное связывание аммиака глутаминовой кислотой в глутамин, количество которого возрас-



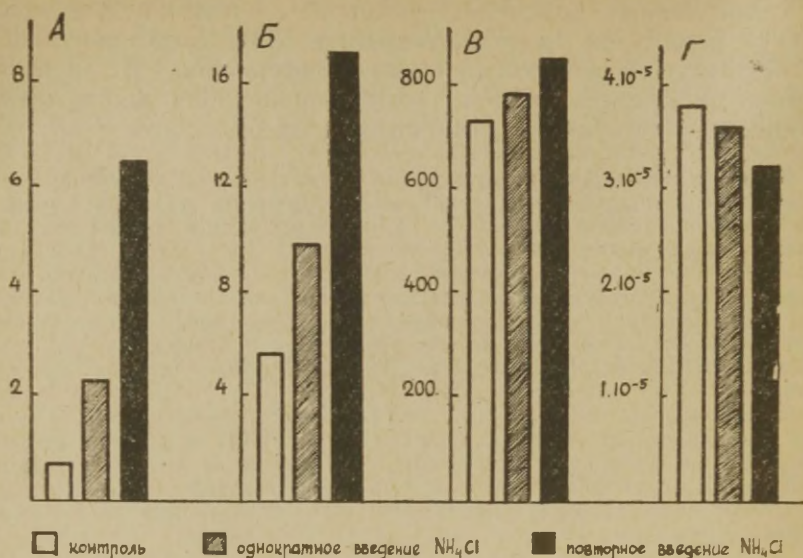


Рис. 1. Содержание аммиака, глутамина, амидного азота белков мозга и их электрофоретическая подвижность при однократном и повторном введении хлористого аммония.

А — азот аммиака (мг%); В — амидный азот белков (мкг/1 г ткани); Г — электрофоретическая подвижность альбуминовой фракции ( $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{вольт}^{-1}$ ).

тает после однократного и еще больше после повторного введения хлористого аммония (рис. 1Б). Однако при экспериментальном накоплении в мозгу аммиака в его связывании принимают участие и белки мозга путем их усиленного амидирования. Вместе с тем при повторном введении хлористого аммония более длительное действие аммиака приводит к более выраженному увеличению степени амидирования белков мозга по сравнению с однократным введением (рис. 1В). Эти результаты находятся в соответствии с данными нашей предыдущей работы (26), а также работы Вельша с сотр. (42) о прижизненном участии белков в связывании аммиака при его экспериментальном накоплении. Как показали электрофоретические и спектрофотометрические исследования, усиление степени амидирования белков сопровождается изменением их физико-химического состояния. Оказалось, что увеличение степени амидирования сопровождается уменьшением ЭФ подвижности альбуминовой фракции растворимых белков мозга. При этом существенно, что при повторном введении аммиака, когда степень амидирования увеличивается больше по сравнению с однократным введением, и ЭФ подвижность уменьшается больше (рис. 1Г). Это объясняется, очевидно, уменьшением суммарного отрицательного заряда белков мозга

Рис. 2. Коэффициент ионизации боковых групп (КИБГ) растворимых белков мозга при однократном введении хлористого аммония.

— контроль;  
- - - опыт.

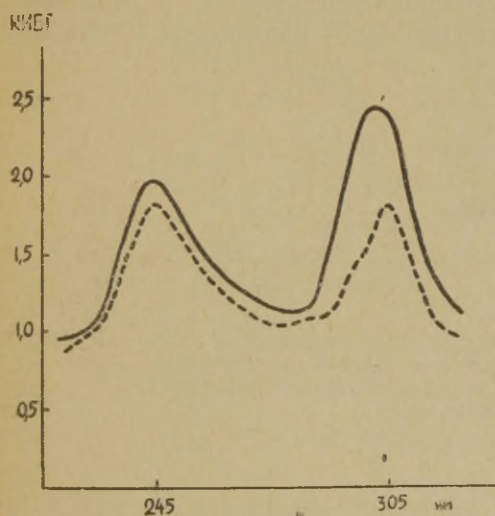
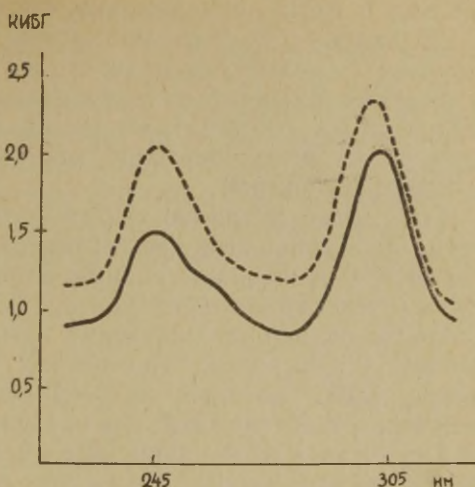


Рис. 3. Коэффициент ионизации боковых групп (КИБГ) растворимых белков мозга при повторном введении хлористого аммония.

— контроль;  
- - - опыт.

(связывание ионизирующих карбоксильных групп аммиаком) и находится в соответствии с недавними данными о возможности определения количества амидного азота пептидов при помощи ЭФ подвижности (43).

Различная степень амидирования белков мозга по-разному отражается и на их дифференциальных УФ спектрах поглощения. При однократном введении хлористого аммония было найдено увеличение КИБГ как при 245, так и при 305 нм, а при повторном введении хлористого аммония более выраженная степень амидирования белков мозга приводит уже к понижению КИБГ при этих же длинах волн (рис. 3). По Унгару (38, 44) из-

менения в КИБГ означают конформационную перестройку белков в растворе. В свете этих данных в сопоставлении с нашими результатами можно думать, что в условиях экспериментального накопления аммиака в мозгу различной степени амидирования белков мозга соответствует их различное физико-химическое и конформационное состояние (по электрофоретическим и спектральным свойствам).

Еще более наглядно обратимость амидирования и ее отражение на физико-химическом состоянии белков мозга выступает в опытах с экспериментальным аллоксановым диабетом и с введением центедрина (стимулятор ЦНС).

После подкожного введения крысам 0,2 г/кг аллоксана у них через 1—2 дня развивается острый диабет с повышенной активностью ЦНС, который на 3—4 день переходит в характерное состояние диабетической комы. Оказалось, что в состоянии острого диабета в мозгу происходит усиленное образование аммиака как из глутамина, так и за счет дезамидирования белков мозга, амидный азот которых уменьшается (рис. 4; А, Б и В-1). Наоборот, в стадии диабетической комы отмечается связывание

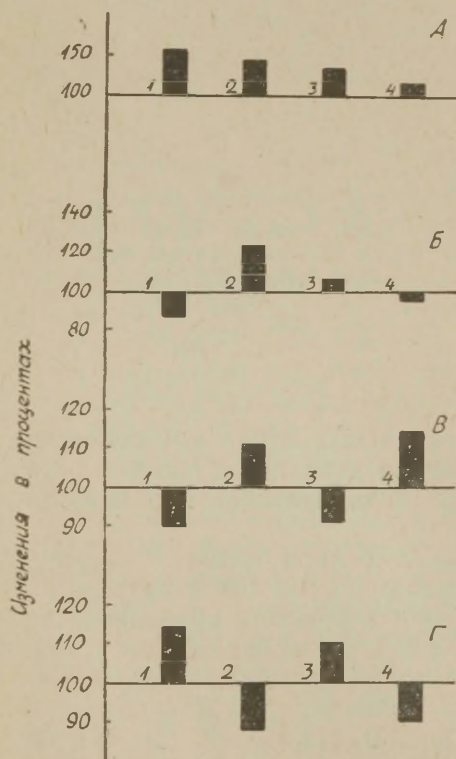


Рис. 4. Изменения в процентах азота аммиака (А), амидного азота глутамина (Б) и белков мозга (В) и электрофоретической подвижности альбуминовой фракции мозга (Г) при аллоксановом диабете и введении центедрина в отношении контроля (100%).

1 — острая стадия диабета; 2 — диабетическая кома; 3 — 60 минут после введения центедрина; 4 — 120 минут после введения центедрина.



аммиака как в виде глутамина, так и в виде амидных групп белков мозга, в результате чего степень амидирования белков мозга увеличивается (рис. 4; А, Б, В-2). Различной степени амидирования соответствуют противоположные изменения в их физико-химическом состоянии: уменьшение степени амидирования в острой стадии диабета сопровождается увеличением ЭФ подвижности (рис. 4; Г-1) и увеличением УФ спектров поглощения при 260—280 нм (рис. 5А); а увеличение степени амидирования в состоянии диабетической комы приводит соответственно к уменьшению ЭФ подвижности (рис. 4; Г-2) и УФ спектров поглощения (рис. 5Б).

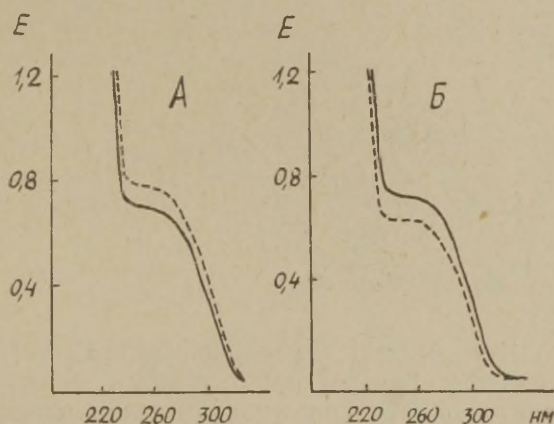


Рис. 5. Ультрафиолетовые спектры поглощения растворимых белков мозга в острой стадии аллоксанового диабета (А) и при диабетической коме (Б).  
 ————— контроль; — — — — — опыт.

Опыты с центедрином (риталином) были проведены на морских свинках (Э. К. Тийгимяз). Оказалось, что при введении 20 мг/кг центедрина через 60 минут наблюдается увеличение количества аммиака в мозгу преимущественно за счет дезамидирования белков мозга (изменения количества амидного азота глутамина оказались статистически недостоверными (рис. 4; А, Б, В-3). При удлинении действия центедрина до 120 минут образующийся на первой стадии аммиак усиленно связывается белками мозга, происходит их амидирование (рис. 4; А, Б, В-4). И в этих опытах различной степени амидирования белков мозга соответствуют противоположные изменения в их физико-химическом состоянии: дезамидирование белков мозга через 60 минут после введения центедрина сопровождается увеличением ЭФ

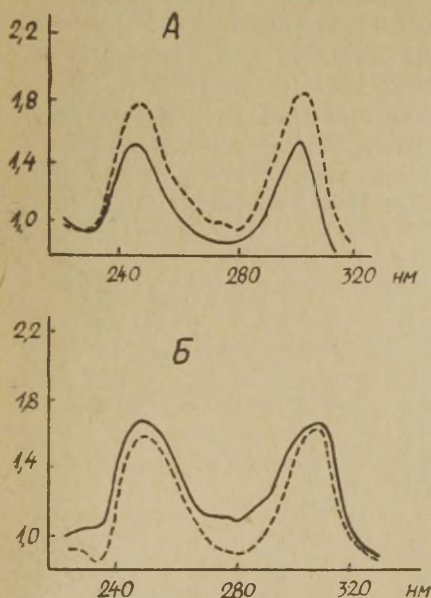


Рис. 6. Коэффициент ионизации боковых групп (КИБГ) растворимых белков мозга через 60 минут (А) и 120 минут (Б) после введения центедрина.

— контроль; — — — — опыт.

подвижности (рис. 4; Г-3) и увеличением КИБГ (рис. 6А); наоборот, увеличение степени амидирования белков мозга при удлинении действия центедрина до 120 минут приводит к уменьшению ЭФ подвижности (рис. 4; Г-4) и уменьшению КИБГ (рис. 6Б). Обратимость амидирования и соответствующие ей противоположные изменения в физико-химическом состоянии белков мозга в этих опытах, как и в нашей предыдущей работе с электрическим раздражением различной длительности (28), отражают, по-видимому, переход возбуждения ЦНС в состояние запредельного торможения.

Обратимые сдвиги в степени амидирования и соответствующие изменения в физико-химическом состоянии белков мозга в связи с функциональным состоянием ЦНС были получены в нашей лаборатории под действием имипрамина (45, 46), а также АКТГ и кортизона (47).

Таким образом, представленные данные в сопоставлении с предыдущими работами нашей лаборатории свидетельствуют о том, что белки мозга *in vivo* путем подвижного обратимого амидирования активно вовлекаются в азотистый обмен нервной ткани, что отражается также в обратимых переходах их физико-химического и конформационного состояния. При этом направленность включения белков в азотистый обмен и изменения вследствие этого их физико-химического состояния находится в

тесной связи с функциональным состоянием ЦНС. Поскольку физико-химические и конформационные перестройки белков не могут не отразиться на их биологической активности, представляется перспективным выявление роли обратимого амидирования отдельных белковых фракций и, в частности, каталитически активных белков в обмене и функциях нервной системы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова Е. А., В сб.: Биохимия нервной системы. Изд. АН Укр. ССР, Киев, 47, 1954.
2. Палладин А. В., В кн.: Вопросы биохимии нервной системы. Изд. АН Укр. ССР, Киев, 123, 1965.
3. Кометнани П. А., Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвалия Н. В., Чикваидзе В. Н., в кн.: Вопросы биохимии нервной и мышечной системы. Изд. АН Груз. ССР, Тбилиси, 41, 1965.
4. Weil-Malherbe H., In: Neurochemistry, Editors Page I. et al., Sec. Edition, C. C. Thomas, Springfield 321, 1962.
5. Waelsch H., Nitrogen metabolism and cerebral function. Стенограмма лекции, прочитанной на научном совещании, посвященном 150-летию со дня рождения И. М. Сеченова. Ленинград, 1966.
6. Tower D. B., Am. J. Clin. Nutr. 12, 308, 1963.
7. Ган М., Массен В. М., Ненцкий М. В., Павлов И. П., Арх. биол. наук 1, 400, 1892.
8. Bessman G. P., Proc. 4th Internat. Congress of Biochem., Vienna 3, 141, 1959.
9. Manning R. T., Biochem. Clin. 3, 225, 1964.
10. Tower D. B., In: The neurochemistry of nucleotides and amino acids. Editors Brady R. O. et Tower D. B., Wiley N. Y. — London, 173, 1960.
11. Палладин А. В., Укр. биохим. ж. 34, № 4, 621, 1962.
12. Бунятян Г. Х., Данный сборник, стр. 49.
13. Weil-Malherbe H., Physiol. Rev. 30, 549, 1950.
14. Владимирова Е. А. В сб.: Вопросы физиологии и морфологии центральной нервной системы. М., 97, 1953.
15. Фердман Д. Л., Эпштейн С. Ф., Укр. биохим. ж. 25, 288, 1953.
16. Vrba R., Nature 176, 117, 1955; 176, 1278, 1955.
17. Врба Р., Усп. соврем. биол. 41, 321, 1956.
18. Weil-Malherbe H., Drysdale A. C., J. Neurochem. 1, 250, 1957.
19. Врба Р., Фолбергрова Я., Кантурек В., В кн.: Вопросы биохимии нервной системы. Изд. АН Укр. ССР, Киев, 1954, 1957.
20. Tower D. B., In: Structure and function of the cerebral cortex. Editors Tower D. B. and Schade J. P., Elsevier, 411, 1960.
21. Guha S. R., Ghosh B. N., Ghosh J. J., Ann. Biochem. and exp. Med. 19, 255, 1959.
22. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Биохимия 25, 310, 1960.
23. Guha S. R., Ghosh J. J., Ann. Biochem. and exp. Med. 19, 67, 1959.
24. Tower D. B., Peters E. L., Wherrett J. R., J. Biol. Chem. 237, 1861, 1962.
25. Клейн Е. Э., Гвалия Н. В., В кн.: Вопросы биохимии нервной и мышечной систем. Изд. АН Груз. ССР, Тбилиси, 73, 1965.
26. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я. Биохимия 26, 984, 1961.
27. Тяхепыльд Л. Я. Вopr. мед. химии 8, 264, 1962.
28. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Ереван, 295, 1963.
29. Тяхепыльд Л. Я. ДАН СССР, 174, 964, 1962.



30. Гершеневич З. С. I Всесоюзный Биохимический Съезд, Ленинград. Тезисы докладов, вып. I, 116, 1964.
31. Векелер Я. И. Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Ереван, 295, 1963.
32. Гаевская М. С., Носова Е. А., Слез Л. М. Укр. биохим. ж. 37, 691, 1965.
33. Френкель С. Р., Гордиенко Э. А., Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Ереван, 223, 1963.
34. Гордон Б. Г. Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Ереван, 237, 1963.
35. Владимирова Е. А. Данный сборник, стр.
36. Shellman J. A., Shellman C. In: The Proteins. Pergamon Press, vol. II, 1, 1964.
37. Волькенштейн М. В. В кн.: Молекулы и жизнь. Изд. Наука, М., 1965.
38. Ungar G. In: Excitation, C. C. Thomas, Springfield, 1963.
39. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я. В кн.: Проблемы нейрохимии, Ленинград, 46, 1966.
40. Палладин А. В., Полякова Н. М., ДАН СССР 107, 568, 1956.
41. Вундерли Х., В. кн.: Аналитические методы белковой химии. Изд-во И. Л., М., 151, 1963.
42. Berl S., Takagaki G., Clarke D. D., Waelsch H., J. Biol. Chem., 237, 2562, 1962.
43. Offord R. E., Nature (Engl.) 211, № 5049, 591, 1966.
44. Ungar G., Aschheim E., Psychoyos S., Romano D. V., J. Gen. Physiol., 40, 635, 1956.
45. Тийгимяз Э., Тяхепыльд Л., Уч. зап. Тартуского государственного университета, вып. 178, 231, 1965.
46. Тийгимяз Э. К., см. данный сборник, стр. 621.
47. Тяхепыльд А. К., См. данный сборник, стр. 161.

# **О ВЗАИМОСВЯЗИ МЕТАБОЛИЗМА АММИАКА И ОБРАТИМОГО ДЕЗАМИДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА, КАК ЧАСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА МЕХАНИЗМА САМОРЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

**Е. А. Владимирова**

Лаборатория функциональной нейрхимии Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Представление о первостепенной роли белка в жизнедеятельности животного организма, в осуществлении специфической деятельности его органов и тканей, в частности, нервной ткани, нашло экспериментальное подтверждение в работах многих как отечественных, так и зарубежных лабораторий, но прямых биохимических данных о степени участия белков мозга при осуществлении процессов высшей нервной деятельности в доступной нам литературе не встретилось.

Приходится отметить, что и в настоящее время продолжает оставаться большим контраст между достижениями физиологии высшей нервной деятельности и экспериментальным материалом по биохимии этого вопроса. Такое отставание, по-видимому, объясняется прежде всего исключительной сложностью самого объекта изучения.

Применяя павловский метод условных рефлексов в сочетании с биохимическим исследованием больших полушарий мозга крыс, нам удалось обнаружить изменения концентрации свободного аммиака и свободного глутамина, отражающие преобладание возбудительных или тормозных процессов в разные стадии дифференцировочного и угасательного торможений (1).

Предположение о структурных изменениях белков мозга в начальный период возбуждения ЦНС и о восстановлении их исходного состояния по мере развития охранительного торможения нами было высказано ранее (2).

Настоящее сообщение является продолжением опубликованных нами исследований по функциональной биохимии мозга, в дополнение к которым проведены эксперименты с целью изучения непосредственного участия белков головного мозга в осуществлении основных процессов нервной деятельности.

## Методика

Все наши опыты проведены на белых крысах весом 180—200 г. Двигательные пищевые и двигательные оборонительные условные рефлексывырабатывали, пользуясь специально сконструированной нами камерой, приспособленной и для максимально быстрого фиксирования прижизненных биохимических сдвигов в мозгу животного в любой момент проводимого эксперимента.

Биохимическим показателем функционального состояния ЦНС служили концентрация свободного аммиака и глутамина в больших полушариях головного мозга и количество азота лабильных и прочно связанных амидных групп суммарных белков мозга.

## Результаты опытов и их обсуждение

В опытах на белых крысах нами было обнаружено в первые 15 секунд электрокожного раздражения (рис. 1) увеличение концентрации свободного аммиака (на 39%) и незначительное

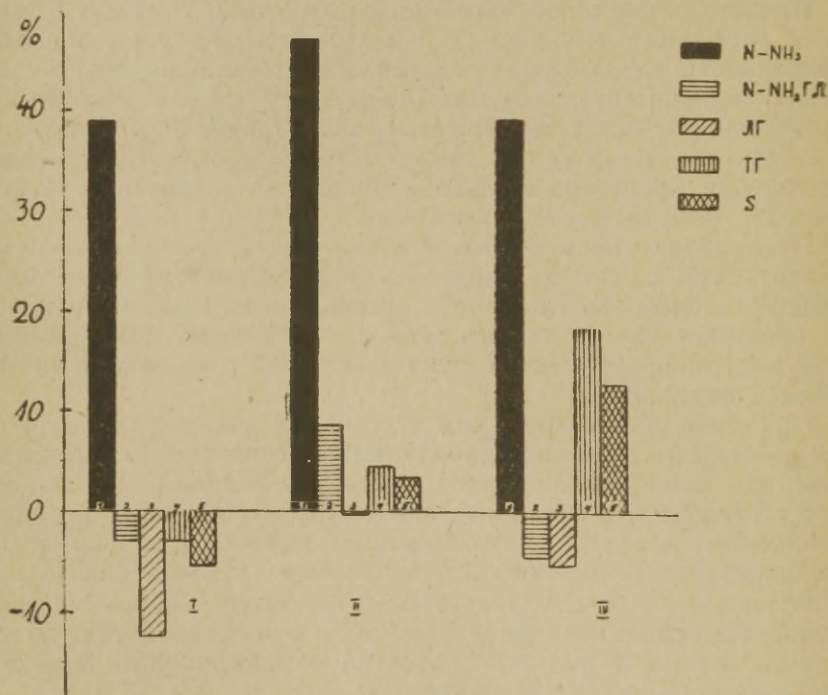


Рис. 1. Изменения содержания свободного аммиака —  $N-NH_3$  (1), амидного азота глутамина  $N-NH_2GL$  (2), легкогидролизруемых — ЛГ (3) трудногидролизруемых — ТГ (4) амидных групп белков мозга и их суммы —  $\Sigma$  (5) в больших полушариях при электрокожном раздражении длительностью 15 сек. (I), 60 сек. (II) и 120 сек. (III), выраженные в % к норме.



уменьшение количества амидного азота свободного глутамина (3,0%). При этом оказалось заметно уменьшенным и содержание легкогидролизуемых амидных групп белков мозга (на 12,4%), трудногидролизуемых на 3% и общей их суммы на 5,4% в отношении к норме (рис. 1, I). При увеличении продолжительности электрокожного раздражения до 60 сек. на фоне возрастающего содержания свободного аммиака (на 47% выше нормы) количество глутамина и амидных групп белков мозга тоже повышалось (рис. 1, II).

Синтез глутамина и амидирование свободных карбоксильных групп белков мозга еще более заметны, если данный прирост выразить в процентах по отношению к исходному уменьшенному их количеству, обнаруженному на 15-ой секунде от начала электрокожного раздражения. При таком сравнении прирост аммиака составляет 6%, но зато глутамина стало больше на 12%, легкогидролизуемых амидных групп — на 14,1%, трудногидролизуемых — на 7,7% и общее количество амидного азота белков мозга возросло на 9,1% (рис. 2, II).

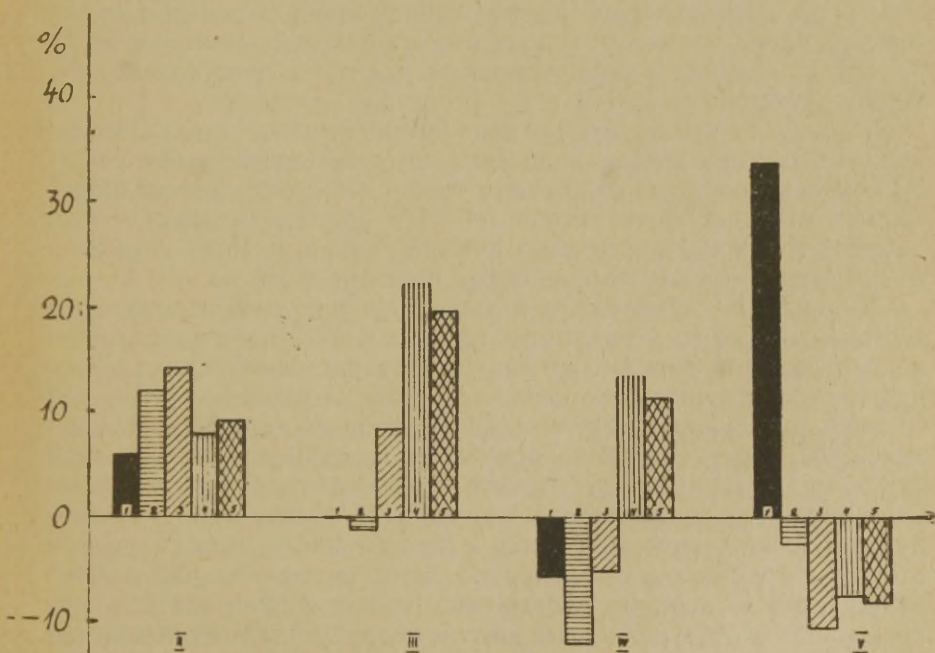


Рис. 2. Изменения содержания тех же компонентов (обозначения на рис. 1) при электрокожном раздражении длительностью 60 сек. (II) и 120 сек. (III), выраженные в % по отношению к содержанию их в первые 15 сек. раздражения, а также при сравнении (III) с (II) как исходным состоянием.

Интересно, что к концу второй минуты прерывистого электрокожного раздражения снова намечается незначительное уменьшение количества свободного глутамина и азота лабильных амидных групп белков, но в данном случае — при одновременно сопутствующем резком увеличении количества азота прочно связанных амидных групп белков (на 18,2%) и общей суммы амидного азота белков мозга (на 12,7%) в сравнении с нормой (рис. 1, III). В действительности же увеличение количества прочно связанных амидных групп белков мозга является еще большим (на 22%), если принять во внимание происшедшую компенсацию части дезамидированного белка в первые 15 секунд с момента возникновения состояния возбуждения (рис. 2, III).

На рисунке 2 отчетливо видно преобладание синтеза свободного глутамина и увеличение количества лабильных амидных групп белков мозга на 60-ой секунде с момента применения электрокожного раздражения, в то время как в следующей фазе — на 120-ой секунде раздражения — преобладает увеличение количества прочно связанных амидных групп белков при сопутствующем уменьшении количества вновь синтезированного свободного глутамина и лабильных связанных амидных групп белков мозга. Это явление можно иллюстрировать и результатом сопоставления количеств исследуемых нами компонентов в мозгу на 120-ой секунде с обнаруженным ранее на предшествующей 60-ой секунде (рис. 2, IV).

Оказалось, что на протяжении второй минуты раздражения произошло уменьшение концентрации свободного аммиака на 5,7%, амидного азота глутамина на 11,9%, азота легкогидролизуемых амидных групп белков на 5,1% при одновременном увеличении трудногидролизуемых амидных групп на 13,2% и общего количества амидного азота белков мозга на 9,1%.

Мы склонны думать, что в данном случае уменьшение количества свободного глутамина при одновременном понижении концентрации свободного аммиака в больших полушариях мозга, в условиях стремительно развивающегося безусловного коркового (охранительного) торможения на фоне состояния возбуждения ЦНС, тесно связано с процессом восстановления исходной структуры макромолекул белков мозга и особенно наиболее реактивного, специфического для нервной ткани белка, дезамидирование которого, возможно, и было первым биохимическим ответом на раздражение нейронов. Отсюда следует, что и мгновенно освобождающийся при этом аммиак может явиться пусковым сигналом к разворачиванию и последующей регуляции цепи ферментативных реакций азотистого метаболизма нервной ткани. К данной мысли побуждает и постоянно наблюдаемый нами факт уменьшения концентрации свободного глутамина и азота легко- и трудногидролизуемых амидных групп белков мозга в первые 15 сек. возникновения возбуждательных процессов, но



при одновременном, наоборот, резком увеличении содержания свободного аммиака как при безусловнорефлекторном, так и условнорефлекторном раздражении (рис. 1, I и рис. 2, V).

Обнаруженное нами волнообразное изменение концентрации свободного глутамина и сопутствующее ему уменьшение и последующее увеличение количества амидного азота белков мозга на фоне высокого уровня свободного аммиака отражают возникновение и постепенное развитие безусловного коркового торможения.

Это явление, как нам кажется, может служить новым подтверждением высказанного нами ранее предположения (2, 3) об использовании вновь синтезированного глутамина в больших полушариях головного мозга в аналогичных условиях опытов именно на восстановление в какой-то степени нарушенной исходной структуры белков мозга. Этот же факт, в свою очередь, подтверждает и специфическую защитную роль охранительного торможения, способствующего восстановлению работоспособности корковых клеток путем нормализации и поддержания тонкой сбалансированности биохимических превращений, обеспечивающих синтез белков, дезамидирование которых, как показали наши опыты, имеет место в первые же секунды возбуждения.

Вместе с тем, указанные изменения азотистого метаболизма свидетельствуют не только о неразрывной взаимосвязи обмена веществ и нервной деятельности, но и являются одной из иллюстраций реального существования единой системы специфической саморегуляции физиологических функций и биохимических превращений, обеспечивающих жизнедеятельность нервных клеток и всего организма.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют, что белки мозга, благодаря их специфическому свойству обратимого дезамидирования и амидирования свободных карбоксильных групп, действительно, наряду с системой глутаминовая кислота — глутамин, участвуют как в образовании, так и в устранении свободного аммиака в мозгу. Что касается роли свободного глутамина в этих процессах, то в литературе продолжает встречаться взгляд на глутамин только как на продукт устранения избытка аммиака. Однако, наш экспериментальный материал показывает, что свободный глутамин при воздействии глутаминазы может дезамидироваться с образованием свободного аммиака в мозгу в физиологических условиях опыта. Но этот процесс проявляется только в первые секунды начальной стадии возбуждения нервной системы, т. е. до момента активации безусловного коркового торможения, когда свободный аммиак находится уже в концентрации, активирующей ферментативный синтез глутамина и амидирование белков мозга при непосредственном участии вновь синтезированного глутамина. Повышение активности глутаминазы установлено недавно (4) в различ-



ных участках головного мозга крыс в первые 15—20 секунд от начала судорог, вызванных акустическим раздражителем.

Аналогичный путь устранения избытка свободного аммиака имеет место и в мышечной ткани, при котором существенную роль играет амидирование белков. Но, как показали исследования Д. Л. Фердмана с сотрудниками, в первую очередь происходит синтез глутамина, который затем входит во взаимодействие с белками мышц (5, 6). Установлено, что скорость синтеза глутамина зависит от величины концентрации свободного аммиака в окружающей среде (7, 8, 9). Однако и в настоящее время еще не выяснен тот порог концентрации свободного аммиака в тканях, при котором меняется характер влияния его на ферментативные процессы нервной ткани целостного организма, обладающего сложной системой защитных механизмов и, в том числе, устраняющих аммиак биохимических циклов.

Так, в случае экспериментального повышения количества свободного аммиака в мозгу путем парентерального введения его животным, а также и при добавлении его к ткани мозга в опытах *in vitro* обнаружено (10, 11) увеличение концентрации пировиноградной,  $\alpha$ -кетогрutarовой и молочной кислот в мозгу вследствие нарушения окислительного декарбоксилирования, именно, под непосредственным влиянием свободного аммиака. Одновременно в мозгу угнетаются и процессы окислительного фосфорилирования, результатом чего является уменьшение количества АТФ, фосфокреатина и увеличение количества неорганического фосфора в мозгу.

Полученные нами данные относительно активного участия белков мозга в азотистом метаболизме соответственно изменениям функционального состояния ЦНС нашли дальнейшее подкрепление в ряде убедительных и последовательных экспериментов Э. Э. Мартинсона и Л. Я. Тяхепыльда (12), посвященных изучению некоторых физико-химических свойств белков при воздействии факторов, повышающих или понижающих деятельность головного мозга. Оказалось, что накопление аммиака в мозгу при парентеральном однократном введении его животным сопровождается амидированием белков мозга и изменением структуры их макромолекул, о чем свидетельствовало уменьшение электрофоретической подвижности некоторых фракций белков и увеличение интенсивности УФ-спектров поглощения. При повторном же введении аммиака общая интенсивность поглощения в той же области наоборот — уменьшалась.

При совместном как однократном, так и повторном введении аммиака и глутаминовой кислоты электрофоретическая подвижность белков мозга не уменьшалась, а увеличивалась в обоих случаях, соответственно изменялась интенсивность УФ-спектров поглощения.

Этими экспериментами доказана возможность связывания

аммиака не только свободной, но и входящей в состав белковых молекул глютаминовой кислотой, и, таким образом, увеличения количества богатых энергией амидных связей белков мозга, влияния определенным образом на их физико-химические свойства и молекулярную структуру.

Интересно, что Э. Э. Мартинсон и Л. Г. Тяхепыльд (13) обнаружили дезамидирование белков мозга, увеличение электрофоретической подвижности некоторых фракций белков мозга и уменьшение интенсивности их УФ-спектров поглощения при сравнительно кратковременном ( $1\frac{1}{2}$ —2 мин.) раздражении электрическим импульсатором с наложением электродов на головы морским свинкам и кроликам; при длительном же воздействии (15—30 мин.) наблюдалось, наоборот, амидирование свободных карбоксильных групп белков мозга, уменьшение электрофоретической подвижности белков и увеличение интенсивности УФ-спектров поглощения.

Иначе говоря, эти факты убедительно свидетельствовали об изменении структуры белковых молекул соответственно функциональному состоянию головного мозга и о непрерывном активном их участии в образовании и устраниении свободного аммиака.

Последнее наблюдение и результаты других экспериментов позволили авторам высказать мысль, что одним из биохимических факторов изменения макроструктуры белков в связи с функциональным состоянием мозга является аммиак, носителем и источником которого служат сами белки в форме обратимо отщепляемых амидных групп. Эти данные подтверждают предположение и других исследователей (14—20) о том, что белки мозга могут быть как источником аммиака, так и его устрани-телем.

С другой стороны, обнаруженное и нами активное участие белков в азотистом метаболизме мозга соответственно взаимодействию возбуждательных и тормозных процессов свидетельствует о возможном реальном изменении физико-химических свойств и конфигурации макромолекул белков мозга уже в очень короткие интервалы воздействия адекватных раздражителей.

Это, в свою очередь, говорит о том, что сам белок может быть источником аммиака в момент его ответной реакции на первичный возбуждающий импульс, но он не единственный, ибо и с наступлением последующего энергичного амидирования белков концентрация свободного аммиака в мозгу длительное время остается повышенной.

Однако, при чрезмерно сильном или чрезмерно длительном раздражении в какой-то момент может произойти нарушение биохимической саморегуляции и тогда развивается в той или иной степени функциональное истощение корковых клеток, сопровождающееся некоторым нарушением и условнорефлекторной деятельности.



Согласно нашим исследованиям, у животных с экспериментально созданным состоянием невроза и резко выраженным двигательным возбуждением даже в период воздействия дифференцировочного раздражителя (до невроза дифференцировка была абсолютной) обнаруживается нарушение саморегуляции и азотистого обмена в больших полушариях мозга.

Особенно наглядно это вырисовывается при сравнении изменений содержания свободного аммиака, глутамина и азота амидных групп белков мозга с интенсивностью метаболизма указанных компонентов в ткани мозга здоровых животных при такой же бурной двигательной оборонительной реакции на электрокожное раздражение и в течение такого же интервала времени — 60 секунд (рис. 3, I и II).

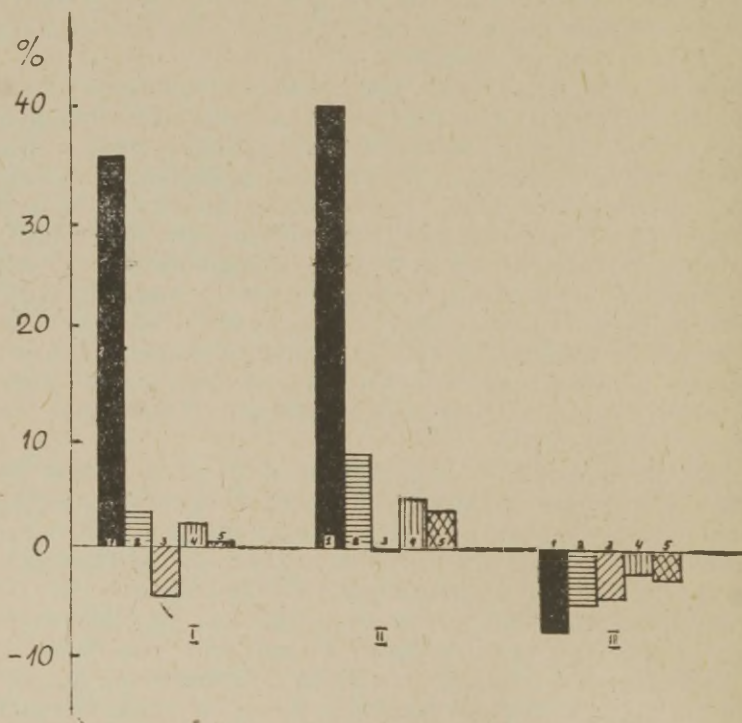


Рис. 3. Изменение содержания тех же компонентов в мозгу невротических (I) и здоровых животных (II) в состоянии резко выраженного двигательного возбуждения длительностью 60 сек. в сравнении с нормой и между собой (III).

Оказалось, что у животных в невротическом состоянии при нарушении своевременного развития безусловного коркового торможения в период действия дифференцировочного раздражителя преобладают процессы диссимиляции.



Выдвигаемое нами представление о безусловном корковом торможении (охранительном) как энзимохимическом свойстве раздражимого субстрата (комплекса белков) нейронов, активно проявляющемся в сложной системе саморегуляции метаболизма и функции нервной ткани как при повышенной деятельности, так и в состоянии относительного покоя, не противоречит учению И. П. Павлова о взаимопереходах возбуждательных и тормозных процессов именно в самих нервных клетках коры больших полушарий. «За этими клетками надо признать», — писал И. П. Павлов (21), — «высшую степень реактивности и, следовательно, разрушаемости».

Эта стремительная функциональная разрушаемость является главным толчком к появлению в клетке особенного процесса торможения, экономического процесса, который не только ограничивает дальнейшее функциональное разрушение, но и способствует восстановлению истраченного раздражимого вещества».

Именно это свойство «особенного процесса торможения — экономического процесса, который ... способствует восстановлению истраченного раздражимого вещества» нам и удалось обнаружить в форме обратимого дезамидирования и амидирования белков мозга.

Согласно биохимическим данным, пусковым фактором возникновения, вернее активации, безусловного коркового торможения — охранительного по функции, является сдвиг обмена веществ в нервных клетках, возникший уже в начальной стадии возбуждения при воздействии как положительных, так и отрицательных условных раздражителей (22, 23).

В настоящее время бесспорно экспериментально доказана более высокая скорость обновления белков именно головного мозга, в сравнении со скоростью обновления белков ряда других органов (24).

Применяя метод электрофореза на агар-агаре, удалось разделить растворимые белки мозга на 16 белковых фракций. Однако и эти электрофоретические фракции не представляют собой индивидуальных белков (25, 26).

В состоянии возбуждения ЦНС усиленному обновлению подвергается фосфор фосфопротеинов мозга (27—30).

Быстрая обмениваемость фосфора фосфопротеинов в мозгу установлена и опытами зарубежных исследователей (31, 32). Оказалось, что скорость обновления белков с высокой обмениваемостью можно измерить только в условиях коротких опытов (16).

Высокая интенсивность обновления белков мозга и взаимосвязь с функциональным состоянием ЦНС представлена в целом ряде экспериментальных работ и обзорных статей. Однако, при рассмотрении литературных данных можно заметить некоторую противоречивость результатов исследования скорости обновле-

ния белков мозга как при возбуждении, так и в случаях торможения нервной деятельности.

Влияние фактора времени при изучении скорости обновления белков в мозгу при состояниях возбуждения и торможения убедительно показано академиком А. В. Палладиным с сотрудниками (33).

Дезамидирование белков мозга с изменением их макроструктуры обнаружено при инсулиновой гипогликемии (34) и при электрораздражении. В последнем случае, по мере увеличения продолжительности раздражения имел место переход к амидированию белков мозга и уменьшению их электрофоретической подвижности (13).

На основе того, что водорастворимые белки как в головном мозгу, так и в периферическом нерве являются наиболее активными и обладающими наиболее интенсивно протекающим обменом, было высказано предположение, что водорастворимые белки мозга являются наиболее важными белковыми веществами нервной ткани (35, 36).

Изменение соотношения лабильных и прочно связанных амидных групп суммарных и водорастворимых белков мозга было обнаружено при возбуждении и дремотном состоянии крыс в условиях кислородной интоксикации (18).

Согласно исследованиям Е. Э. Клейн (37), повышенное образование свободного аммиака в мозгу при воздействии некоторых фармакологических средств обусловлено дезамидированием нерастворимой фракции белков мозга, а устранение его совершается за счет водорастворимых белков и системы глутаминовая кислота—глутамин. Позднее было показано, что и характер изменений количества амидного азота водорастворимой фракции белков мозга взаимосвязан с интенсивностью применяемого электрораздражения (38).

Резкое уменьшение удельной активности белков мозга, судя по скорости включения  $S^{35}$ -метионина, имеет место при функциональном истощении нервной ткани при гипертиреозе (39).

Следует заметить, что скорость обновления белков головного мозга повышается не только при возбуждении ЦНС, но и при разлитом глубоком торможении, в зависимости от предшествующего исходного функционального состояния нервной ткани, от степени ее истощения, на фоне которого животное впадает в сон без применения снотворных веществ.

После чрезмерной истощающей работы последующий сон животных сопровождается усилением синтеза белков головного мозга (40—44), в то время как сон, наступающий после обычного бодрствующего состояния животных, сопровождается некоторым понижением обмена веществ.

Иначе говоря, в том и другом случае проявляется охранительная функция безусловного коркового торможения.



То, что восстановление исходной структуры белков мозга начинается уже в начальной стадии возбуждения ЦНС, т. е. с момента активации безусловного торможения, совпадает с известным представлением о белковой (денатурационной) теории возбуждения, разработанной Д. Н. Насоновым с сотрудниками (45—47). Оказалось, что обратимая денатурация белков протоплазмы лежит в основе не только местного, но и распространяющегося возбуждения, что имеет непосредственное отношение и к изучаемому нами рефлекторному возбуждению больших полушарий головного мозга.

Полученный нами экспериментальный материал, приведенный в данном сообщении, свидетельствует, что одним из пусковых факторов цикла биохимических реакций, сопряженных с возбуждением нервной ткани, является обратимое дезамидирование свободного глутамина и белков мозга с одновременным образованием свободного аммиака, который, в свою очередь, достигнув пороговой концентрации, включается в цикл аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, амидирования свободной глутаминовой кислоты и свободных карбоксильных групп белков мозга.

Достоверность взаимосвязи функционального состояния ЦНС и изменения структуры белковых молекул в настоящее время является экспериментально доказанной (48, 49, 36).

Одной из интереснейших задач современной физиологии и биохимии высшей нервной деятельности является изучение прижизненных изменений макроструктуры и конформации белков мозга при взаимопереходах возбуждательных и тормозных процессов.

Познание природы сложных механизмов взаимодействия процессов высшей нервной деятельности возможно при творческом сочетании павловского метода условных рефлексов и современных методов исследований гетерогенной структуры и функций ЦНС.

Много ценных экспериментальных данных получено посредством применения электрофизиологических и электронномикроскопических методов исследования в области изучения строения и функции синапсов и других структурных образований мозга, участвующих в механизмах передачи нервных импульсов с одного нейрона на другой и в других звеньях условнорефлекторной дуги.

Материал биофизической химии, рассматривающий живой организм как способный к самообновлению белковой открытой системы, способствует пониманию сущности закономерной сопряженности обмена веществ, структуры и функций нервной системы.

Об этом же свидетельствует и классическая формулировка Ф. Энгельса: «Жизнь есть способ существования белковых тел и этот способ существования состоит по своему существу в



постоянном самообновлении химических составных частей этих тел» (50).

Известно также, что катализаторы в открытой системе влияют не только на скорость реакций, но и на стационарные концентрации реагирующих веществ, а возбуждение живых клеток, по существу, является результатом смещения стационарного состояния открытых систем (51, 52).

Таким образом, на основании результатов наших исследований и литературных данных считаем возможным сделать заключение, что в свете теории биологических открытых систем безусловному корковому торможению, свойственному нейронам не только коры больших полушарий, но и других частей мозга, несомненно, принадлежит существенная роль в системе саморегуляции тканевого метаболизма. Вместе с тем наблюдаемое нами при активации безусловного коркового торможения стремительное изменение азотистого метаболизма в направлении восстановления исходной структуры белков мозга соответственно стационарному состоянию относительного покоя, при котором нервная клетка находится в готовности адекватно реагировать на любое даже незначительное изменение в окружающей среде, является одной из иллюстраций основного свойства биологических открытых систем — способности к самообновлению белковых веществ. Отсюда следует и настоятельная необходимость продолжения поисков индивидуального белка или белкового комплекса, специфического для нервной ткани, мгновенно реагирующего на раздражающий импульс дезамидированием, т. е. освождением аммиака.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова Е. А., Физиол. журнал СССР, 46, № 11, 1373, 1960.
2. Владимирова Е. А., Бюлл. exper. биол. и мед., 31, № 4, 228, 1951.
3. Владимирова Е. А., В сб. «Вопросы физиологии и морфологии центральной нервной системы», изд. АМН СССР, 97, 1953.
4. Покровский А. А., Пономарева Л. Г., Журн. высш. нервн. деят., 15, вып. I, 120, 1965.
5. Фердман Д. Л., Эпштейн С. Ф., Укр. биохим. журн., 25, 3, 1953.
6. Эпштейн С. Ф., В сб. «Вопросы биохимии нервной системы», Киев, 212, 1954.
7. Speck J., J. Biol. Chem., 179, 1405, 1949.
8. Tower D. B., Wherret I., McKhann G. M., Regional Neurochem. p. 65, Proc. of the fourth international neurochemical Symposium. Pergamon Press, 1961.
9. Лестровая Н. Н., Биохимия, 19, вып. 4, 478, 1954.
10. Тарве У. С., Вopr. клин. неврологии и психиатрии, Тарту, 2, 52, 1962.
11. Тарве У. С., Труды III Всесоюзн. конфер. по биохимии нервной системы, Ереван, 1963, стр. 271.
12. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Биохимия, 26, № 6, 984, 1961.
13. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Труды III Всесоюзн. конференции по биохимии нервн. системы, Ереван, 1963, стр. 103.
14. Врба Р., Успехи современной биологии, 41, вып. 3, 321, 1956.
15. Врба Р., Фольбергер Я., Кантурек В., В сб. «Вопросы биохимии нервн. сист.» Киев, 1957, стр. 154.

16. Waelsch H., Symposium «Metabolism of nervous System,» London, p. 431, 1957.
17. Тяхепыльд Л. Я., Вопросы медицинской химии, № 3, 264, 1962.
18. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Биохимия 25, 310, 1960.
19. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Биохимия 25, 790, 1960.
20. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина Н. А., Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, Ереван, 1963, стр. 91.
21. Павлов И. П., Полн. собр. сочинений. Изд-во АН СССР, М.-Л., 1951, т. III, кн. 2, стр. 6.
22. Владимирова Е. А., Физиол. журн. СССР, 43, № 2, 117, 1957.
23. Владимирова Е. А., Сб. «Вопросы биохимии нервной системы», Киев, 1957, стр. 164.
24. Палладин А. В., Вестник АН СССР, № 10, 37, 1952.
25. Полякова Н. М., Лишко В. К., Укр. біохім. журнал, 34, 10, 1962.
26. Палладин А. В., Кудинов С. А., Укр. біохім. журн., 36, 548, 1964.
27. Крепс Е. М., Смирнов А. А., Четвериков Д. А., В сб. «Биохимия нервной системы», Киев, 1954, стр. 125.
28. Владимиров Г. Е., В сб. «Биохимия нервной системы», Киев, 1954, стр. 25.
29. Torda C., Amer. I. Physiol., 177, 179, 1954.
30. Захаров Н. В., Орлянская Р. Л., Вопросы мед. химии, 6, 249, 1960.
31. Davidsohn J., Frazer S., Hutchinson W., Biochem. J., 49, 311, 1951.
32. Johnson R., Albert, S. J. Biol. Chem., 200, 335, 1953.
33. Палладин А. В., Белик Я. В., Крачко Л. И., Биохимия 22, 359, 1957.
34. Тяхепыльд Л. Я., ДАН СССР, 147, 964, 1962.
35. Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М., Силич Т. П., В сб. «Вопросы биохимии нервной системы», Киев, 1957, стр. 9.
36. Палладин А. В., Труды III Всес. конференции по биохимии нервной системы, Ереван, 1963, стр. 9.
37. Клейн Е. Э., V Междунар. биохимич. конгресс. Рефераты секц. сообщений, т. 1, стр. 456, Москва, 1961.
38. Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвалья Н. В., Труды III Всес. конференции по биохимии нервной системы, Ереван, 1963, стр. 193.
39. Мартинсон Э. Э., Линд А. Я., I Биохимич. конфер. Прибалт. Республик и Белоруссии, Тарту, 1961, стр. 62.
40. Врба Р., Успехи совр. биологии, 41, 321, 1956.
41. Врба Р., Чехословацкое мед. обозрение III, стр. 111, 1957.
42. Погодаев К. И., Турова Н. Ф., Савченко З. И., V Международный биохимический конгресс. Рефераты секц. сообщ., т. 1, 468, Москва, 1961.
43. Шняк Э. И., ДАН СССР, 146, 3, 734, 1962.
44. Vrba R., Nature, 176, № 4436, 1258, 1955.
45. Насонов Д. Н., Александров В. Я., Реакция живого вещества на внешн. воздействия». Изд-во АН СССР, М.-Л., 1940.
46. Насонов Д. Н., Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. Изд-во АН СССР, М.-Л., 1962, стр. 203.
47. Трошин А. С., IX Съезд Всесоюзн. общества физиол. биохим. и фармакологов, т. 3, 105, 1959, Москва-Минск.
48. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Труды I биохимической конфер. Прибалтийских республик и Белоруссии, Тарту, 1961, стр. 26.
49. Унгар Дж., В сб. «Проблемы эволюции функций и энзимохимии процессов возбуждения». Изд-во АН СССР, 1961, стр. 343.
50. Энгельс Ф., Анти-Дюринг, 1953, стр. 77.
51. Пасынский А. Г., Успехи современной биологии, 43, вып. 3, 263, 1957.
52. Пасынский А. Г., Биофизическая химия. Изд-во «Высшая школа», М., 1963.



## ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ И АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТ КАК ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

В. Н. Чикваидзе, Г. Г. Шамкулашвили

Институт физиологии АН Грузинской ССР, Тбилиси

Рядом исследователей было показано, что окисление значительной части глюкозы в головном мозгу идет не прямо с образованием углекислоты, а через новообразование аминокислот, которые в дальнейшем подвергаются окислению (1). Изотопными методами исследования также установлено, что свободные аминокислоты в головном мозгу обладают очень большой скоростью обновления (2—3). До последнего времени было известно, что из свободных аминокислот только глутамат может быть использован тканью мозга в качестве субстрата окисления. Дальнейшими исследованиями было установлено, что и  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) может стимулировать дыхание срезов мозга (4), хотя по этому поводу в литературе нет единого мнения (5). Участие аспартата в окислительных процессах головного мозга остается пока неизученным. В настоящее время этот вопрос привлекает особое внимание, так как было установлено, что 80—90% окисленного глутамата в мозгу превращается в аспартат (6), что указывает на важную роль этого соединения в метаболизме мозговой ткани. Интересно отметить, что в результате окисления из ГАМК, в виде промежуточного продукта, образуется также аспартат.

В настоящем исследовании была поставлена задача выяснить участие ГАМК и аспартата в энергетическом обмене мозговой ткани.

### Методика работы

Опыты были проведены инкубацией срезов коры головного мозга крыс. Условия инкубации были аналогичны прежним исследованиям (4). Измерение потребления кислорода производилось манометрическим методом Варбурга.

Окислительное фосфорилирование изучалось на препаратах изолированных митохондрий коры головного мозга взрослых крыс. После декапитирования животного быстро извлекался мозг и на холоду готовился 10% гомогенат в



растворе 0.32 М сахарозы. Ядра и крупные оболочки клетки отделяли центрифугированием на холоду при 1000 *g* в течение 10 мин. Митохондриальная фракция выделялась двукратным центрифугированием при 16 000 *g* по 15 мин. Осадок митохондрий суспендировали в солевом растворе, имеющем конечную концентрацию: калиевый фосфатный буфер (рН — 7,4) — 10 мМ, трис (рН — 7,4) — 20 мМ, ЭДТА — 2 мМ (рН — 7,4), NaF — 10 мМ, KCl — 50 мМ, MgCl<sub>2</sub> — 8 мМ, глюкоза — 20 мМ, АТФ — 2 мМ, гексокиназа — 2 мМ (*Sigma type III*), субстраты окисления — 10 мМ,  $\alpha$ -кетоглутарат — 5 мМ, пиридоксальфосфат — 0,5 мМ. Инкубацию проводили в аппарате Варбурга в течение 30 минут при 37° С. После инкубации в сосудики Варбурга добавлялся холодный раствор трихлоруксусной кислоты, осадок отделялся центрифугированием и в надосадочной жидкости определялся неорганический фосфор по Фiske-Суббароу. Потребление кислорода и неорганического фосфора рассчитывалось в мкг-атомах на 100 мг свежей ткани.

## Полученные данные и их обсуждение

По данным Бономи и Тонкони (7), аспартат не влияет на поглощение кислорода срезами головного мозга. Вместе с тем, они обнаружили, что глюкоза оказывала положительное влияние на использование аспартата как энергетического материала. Стимулирование обмена аминокислот в присутствии глюкозы наблюдали и другие исследователи (1, 2).

Поскольку нами уже было изучено влияние ГАМК на мозговое дыхание, в настоящем исследовании мы определяли только влияние аспартата на потребление кислорода срезами коры головного мозга крыс при рН 7,4 и 8,2. Было изучено также влияние глюкозы на эффект аспартата.

Таблица I

Влияние аспартата на потребление кислорода срезами головного мозга крыс в мкг-атомах/г ткани в продолжение 1 часа инкубации (средние из 8 опытов)

	рН — 7,4			рН — 8,2		
	Среднее арифметическое	М $\pm$ м разностей	Изменение в %	Среднее арифметическое	М $\pm$ м разностей	Изменение в %
Контроль	26,0			12,5		
Глюкоза	52,5	+26,0 $\pm$ 3,8	+102	45,0	+34,5 $\pm$ 1,95	+260
Аспартат	20,5	—5,5 $\pm$ 1,3	—21	15,5	+3,1 $\pm$ 1,20	+24
Аспартат + глюкоза	54,0	+27,0 $\pm$ 2,0	+108	53,0	+41,5 $\pm$ 2,85	+324

Все полученные данные статистически достоверны.

Из полученных данных выясняется (табл. 1), что аспарат при рН 7,4 оказывает отрицательное влияние на потребление кислорода. Его положительный эффект появляется в присутствии глюкозы. Прирост потребления кислорода — до 129%. Еще резче выявляется положительное влияние глюкозы на использование аспарата в окислительных процессах в опытах, где рН среды был равен 8,2. При одновременном добавлении в инкубационную среду аспарата,  $\alpha$ -кетоглутарата и пиридоксальфосфата (рН 8,2) срезами мозга потребляется гораздо больше кислорода, чем в опытах, где использовался только  $\alpha$ -кетоглутарат (табл. 2). Как видно, аспарат может стимулировать дыхание мозговой ткани в условиях ее переаминирования.

Таблица 2

Влияние  $\alpha$ -кетоглутарата на использование аспарата как субстрата окисления. Потребление кислорода в мкг-атомах/г ткани в течение 1 часа инкубации, рН — 7,4 (средние из 8 опытов)

	Среднее арифметическое	$M \pm m$ разностей	$P <$	Изменения в %
Контроль	22,5			
$\alpha$ -кетоглутарат	35,5	$+20 \pm 0,25$	0,001	+58
Аспарат	16,0	$-6,5 \pm 1,25$	0,02	-29
Аспарат + $\alpha$ -кетоглутарат + пиридоксальфосфат	45,0	$+22,5 \pm 2,35$	0,001	+100

Учитывая вышеуказанное предположение, при изучении влияния аспарата на окислительное фосфорилирование в качестве акцептора аминной группы был взят  $\alpha$ -кетоглутарат. Из данных, приведенных в таблице 3, выясняется, что аспарат оказывает слабое влияние как на потребление кислорода, так и на эстерификацию фосфора, т. е. он оказался малоэффективным в окислительном фосфорилировании. При создании условий трансаминирования в присутствии  $\alpha$ -кетоглутарата и пиридоксальфосфата аспарат значительно усиливает потребление кислорода и эстерификацию фосфора. Эти данные наглядно показывают, что аспарат может включаться в энергетический метаболизм мозговой ткани только путем дезаминирования.

Таблица 3

Участие аспартата в окислительном фосфорилировании. Продолжительность инкубации 30 мин. Потребление кислорода и фосфора рассчитано в мкг-атомах на 100 мг свежей ткани

	ΔO	ΔP	P/O
Аспартат	0,7	1,06	1,5
α-кетоглутарат	2,4	7,5	3,2
Аспартат + α-кетоглутарат + пиридоксаль-фосфат	2,8	9,0	3,2

Нашими прежними исследованиями было установлено, что ГАМК при наличии в инкубационной среде кетокислот может стимулировать дыхание мозговой ткани (4). Отсюда было сделано заключение, что ГАМК должна принимать участие в энергетическом обмене головного мозга в условиях, обеспечивающих ее дезаминирование.

Окислительное фосфорилирование в опытах с ГАМК было изучено также на препаратах митохондрий коры головного мозга крыс. В качестве субстрата окисления была взята ГАМК в отдельности и в комбинации с глутаматом, кетоглутаратом, сукцинатом и оксальацетатом.

Результаты опытов, представленные на рис. 1, показывают, что ГАМК, взятая в отдельности, не оказывает положительного влияния на окислительное фосфорилирование ( $P/O = 0,92$ ).

Значительно усиливаются потребление кислорода и эстерификация фосфора в присутствии глутамата ( $P/O = 1,73$ ).

Как и следовало ожидать, компоненты лимоннокислого цикла: α-кетоглутарат, сукцинат и оксальацетат — оказались весьма эффективными субстратами в окислительном фосфорилировании. Это сказывается не только в усилении потребления кислорода и в эстерификации фосфора, но и в высоких величинах  $P/O$ .

Для создания оптимальных условий трансаминирования, в дальнейших исследованиях в инкубационную среду одновременно с ГАМК добавляли пиридоксальфосфат как кофактор и один из компонентов лимоннокислого цикла как акцептор аминокислотной группы. Как выяснилось, в этих условиях ГАМК значительно стимулирует окислительное фосфорилирование. Положительное влияние ГАМК на окислительное фосфорилирование максимально выражено в опытах совместного присутствия ГАМК с кетокислотами: α-кетоглутаратом и оксальацетатом.



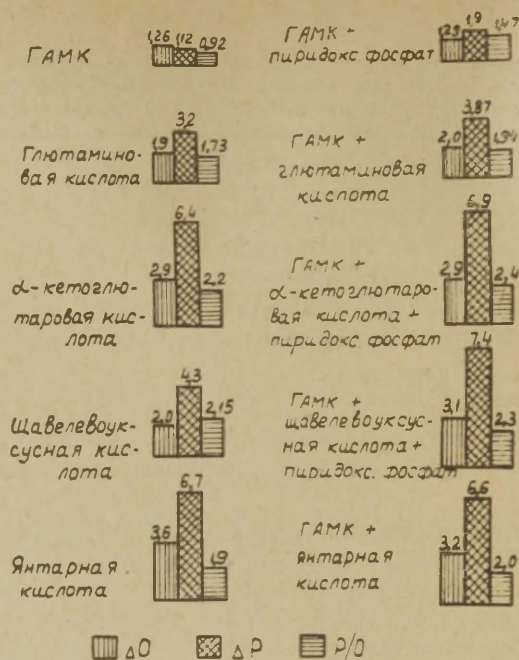


Рис. 1. Участие  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в окислительном фосфорилировании.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что ГАМК может быть использована тканью мозга в окислительном фосфорилировании после дезаминирования. Получаемый в результате дезаминирования полуальдегид янтарной кислоты, по-видимому, является лучшим субстратом окисления, чем кетокислоты и сукцинат.

В последней серии опытов было изучено влияние фармакологических веществ на участие ГАМК в окислительном фосфорилировании. Из возбуждающих веществ изучалось воздействие семикарбазида, метразола и фенамина, а из тормозящих — нембутала, аминазина и хлоралгидрата.

Фармакологические вещества или предварительно вводились животным и затем инкубировались митохондриальные препараты, или непосредственно добавлялись в инкубационную среду.

В результате исследований было выяснено, что в опытах с добавлением фармакологических веществ в инкубационную среду обнаруживаются более резкие сдвиги. А именно, нембутал, аминазин и хлоралгидрат значительно подавляют потребление

кислорода и эстерификацию фосфора митохондриями мозга, что сопровождается сильным уменьшением коэффициента Р/О. При одновременном добавлении ГАМК эффект отрицательного влияния вышеупомянутых веществ не меняется. Отрицательное влияние семикарбазида, фенамина и особенно метразола выявляется в меньшей степени (табл. 4).

Таблица 4

Влияние фармакологических веществ *in vitro* на окислительное фосфорилирование в митохондриях, полученных из 100 мг свежей мозговой ткани. Инкубация 30 мин. (фосфатный буфер, рН — 7,4)

	Конеч. конц. в мМ	$\alpha$ -кетоглю- тарат			Глютамат			Оксальацетат		
		ΔО	ΔР	Р/О	ΔО	ΔР	Р/О	ΔО	ΔР	Р/О
Контроль		2,41	5,39	2,23	1,42	2,34	1,64	2,43	5,7	2,34
Аминазин	2,8	0,11	0,08	0,70	0,19	0,04	0,21	1,25	1,10	0,87
ГАМК + амина- зин		0,05	0,03	0,60	0,26	0,15	0,57	1,01	0,91	0,90
Нембутал	9,4	0,30	0,15	0,50	0,19	0,09	0,42	0,13	0,08	0,61
ГАМК + нембу- тал		0,29	0,10	0,34	0,23	0,07	0,30	0,17	0,05	0,30
Хлоралгидрат	61,4	0,41	0,31	0,76	0,58	0,82	1,41	0,38	0,23	0,60
ГАМК + хло- ралгидрат		0,37	0,24	0,64	0,77	0,88	1,14	0,60	0,53	0,88
Метразол	15,4	2,49	4,19	1,68	1,14	2,80	2,46	1,87	4,48	2,39
ГАМК + метра- зол		2,16	4,38	2,02	1,23	2,72	2,21	1,88	4,0	2,12
Семикарбазид	92	0,35	0,44	1,25	0,75	1,14	1,51	0,39	0,76	1,94
ГАМК + семи- карбазид		0,46	0,53	1,15	0,95	1,08	1,14	0,53	1,06	1,98
Фенамин	21,5	0,92	1,04	1,13	0,73	0,8	1,09	1,07	1,50	1,39
ГАМК + фена- мин		0,97	1,30	1,33	1,02	0,66	0,65	0,90	1,48	1,49

Более сложные взаимоотношения были получены в опытах, в которых животным предварительно вводились фармакологические вещества (табл. 5). В опытах с  $\alpha$ -кетоглутаратом депрессанты тормозили окислительное фосфорилирование, а стимуляторы или не оказывали влияния, или же стимулировали (метразол).

Противоположная картина наблюдается в опытах, в которых в качестве субстрата брался глютамат. ГАМК в этих условиях не вносит особых изменений в общую картину.

Отрицательное влияние депрессантов и стимулятора фенамина на процесс окислительного фосфорилирования должно являться результатом подавления ими дыхания мозговой ткани

Влияние фармакологических веществ на окислительное фосфорилирование в митохондриях мозга, полученных из 100 мг свежей ткани после предварительного введения их животным. Инкубация 30 мин. (фосфатный буфер, pH — 7,4).

	Доза мг/кг	$\alpha$ -кетоглюта- рат			Глютамат			Оксальацетат		
		$\Delta O$	$\Delta P$	P/O	$\Delta O$	$\Delta P$	P/O	$\Delta O$	$\Delta P$	P/O
Контроль	20	1,48	3,79	2,56	1,31	2,38	1,81	1,12	2,27	2,02
Аминазин		1,63	3,59	2,20	1,22	2,70	2,21	2,12	2,42	2,00
ГАМК + амина- зин	50	1,83	3,72	2,02	1,39	3,16	2,27	1,43	2,83	1,98
Нембутал		1,57	3,51	2,22	1,01	1,88	1,86	0,99	2,32	2,33
ГАМК + нембу- тал	250	1,84	3,50	1,90	0,96	2,02	2,10	1,28	2,37	1,84
Хлоралгидрат		2,24	3,52	1,57	1,05	2,23	2,12	1,24	2,75	2,21
ГАМК + хлорал- гидрат	60	2,10	3,52	1,67	1,05	2,19	2,08	1,34	2,88	2,14
Метразол		1,52	4,37	2,86	2,08	2,59	1,24	1,17	2,22	1,90
ГАМК + метра- зол	250	1,69	5,41	3,20	2,04	2,47	1,21	1,32	2,39	1,81
Семикарбазид		1,84	4,55	2,47	2,35	2,60	1,10	1,36	2,55	1,86
ГАМК + семи- карбазид	10	2,09	4,87	2,32	2,21	2,52	1,14	1,35	2,25	1,67
Фенамин		1,42	3,43	2,41	2,60	3,81	1,46	1,33	2,02	1,51
ГАМК + фена- мин		1,55	3,35	2,15	2,45	3,43	1,40	1,40	2,22	1,44

(4, 8). Метразол и семикарбазид, не влияя на потребление кислорода (4), не оказывали влияния также на окислительное фосфорилирование.

### Выводы

1. Аспартат усиливает потребление кислорода срезами головного мозга в условиях его дезаминирования.
2. Глюкоза стимулирует потребление аспартата в мозговой ткани.
3. ГАМК может включаться в энергетический обмен мозга только в условиях обеспечения ее переаминирования.
4. Фармакологические вещества, подавляющие дыхание мозговой ткани, отрицательно влияют на процесс окислительного фосфорилирования.
5. Влияние фармакологических веществ на процесс окислительного фосфорилирования зависит от используемого субстрата.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Chain E. B., Cohen M. M., Pocchiari F., Proc. Roy. Soc., **156**, 163, 1962.
2. Sellinger O. Z., Catangaro R., Chain E. B., Pocchiari F., Proc. Roy. Soc. **156**, 148, 1962.
3. Kini M. M., Quastel J. H., Nature, **184**, 252, 1959.
4. Чикваидзе В. Н., Укр. биох. журнал, № 1, 62, 1966.
5. Бунятян Г. Х., Егян В. Б., Туршян Г. А., В кн.: Вопросы биохимии мозга, **1**, 27, 1964, Ереван.
6. Haslam R. Y., Krebs H. A., Biochem. J., **88**, 566, 1963.
7. Bonomi U., Tonconi L. T., Ital. J. Biochem., **11**, 146, 1962.
8. Ernsting M. I. E., Kafoc W. F., Nauti W. Th., Oousterhois H. K., J. Neurochem., **5**, 121, 1960.

## ГЛЮТАМИН, ГЛЮТАМИНОВАЯ И $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНАЯ КИСЛОТЫ ГЛИАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ МОЗГА

М. Ш. Промыслов и Т. В. Андреева

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Учитывая особое значение соотношения аммиак—глутаминовая кислота—глутамин в ткани мозга животных как одного из факторов выражения химической сущности основных физиологических процессов нервной системы — возбуждения и торможения, мы исследовали некоторые из этих компонентов и процессы их превращения в ткани глиальных опухолей мозга.

В данном случае мы стремились использовать опухолевую ткань в качестве экспериментальной модели для изучения некоторых сторон биохимической характеристики нейроглии.

Учитывая особенности опухолевой ткани и условность такого подхода к ее исследованию, нам все же удалось установить ряд положений, которые могут быть признаны характерными именно для нейроглии.

Исследованию подвергалась ткань мозга и его глиальные опухоли, взятые у человека, кроликов и мышей. Все опухоли проходили морфологический контроль. В первой серии опытов мы определяли содержание глутаминовой кислоты и глутамина, а также уровень процесса разложения глутамина в названных образованиях. Как видно из таблицы 1, содержание глутаминовой кислоты и глутамина в глиальной опухолевой ткани не отличается от такового в мозгу. Интенсивность разложения глутамина опухолевой тканью также не отличается от той, которую мы нашли в мозгу. Эти данные повторяются у мышей, у кроликов и у человека (табл. 2). Что касается человеческого мозга, то у нас была возможность только один раз определить активность этого процесса в ткани, близлежащей к опухоли, полученной во время операции. Исследуемый материал был в основном белым веществом мозга. Полученные результаты совпадают с теми, которые получены нами для опухолей. Если учесть еще и то, что способность опухолевой ткани к разложению глутамина не зависит от степени потери ее клетками дифференцировки,

Таблица 1

Содержание глутаминовой кислоты и глутамина в мозгу и в опухолевой ткани

Содержание глутаминовой к-ты в мг%		Содержание глутамина в мг%	
Мозг	Опухоль	Мозг	Опухоль
Мыши	Мыши	Мыши	Мыши
156	117,7	7,8	4,7
140	138,9	4,6	3,6
120	116,0	5,6	8,3
125	133,3	4,3	4,7
107	146,6	3,9	4,4
100	113,0	5,24	5,14
123	138,9	Человек	Человек
144	117,7		
		8,2	11,3
			8,1
			7,3
		10,2	9,9
			5,0
Ср.	126,5		8,2

Таблица 2

Разложение глутамина в мг/1 гр. ткани, в 1 час, 37°C

Мозг		Опухоль		
Мыши	Кролики	Мыши	Кролики	Человек
0,806	0,973	1,096	0,980	Астроцитомы
0,985	0,910	1,04	1,154	"
0,960	1,200	1,04	1,108	"
1,110	0,790	1,335	0,994	"
0,980	0,875	1,328		Доброкачеств.
1,110	1,357			глиальная
1,064	1,109			Протоплазм. астр.
0,834				Дедифференц.
				астр.
				Спонгиобл. меду.
				Мультиформ.
				медул
				"
				"
Ср.	0,981	1,03	1,1678	1,059
				0,838



что четко следует из данных табл. 2 по опухолям мозга человека, то это дает основание думать, что уровень полученной нами активности этого процесса характерен не столько для опухолевой ткани, сколько вообще для нейроглии. То же можно сказать и о количественном содержании глютаминовой кислоты и глютамина.

Далее мы исследовали количество ГАМК и активность декарбоксилазы глютаминовой кислоты в ткани опухолей мозга. Как следует из таблицы 3, количества ГАМК в мозгу мыши и кролика примерно одинаковы, а в опухоли количество ГАМК формально в три раза меньше. В ткани опухоли мозга человека содержание ГАМК еще меньше. Формально потому, что по существу это только следы, которые могут попасть в исследуемую опухолевую ткань из небольших примесей мозговой ткани.

Таблица 3

Содержание ГАМК (в мг%) в мозгу и в опухолевой ткани

Мозг		Опухоль	
Мыши	Кролики	Кролики	Человек
26,6	18,1	5,82	1,7
23,3	18,1	5,82	6,47
20,8	25,3	7,57	3,00
26,7	24,6	7,41	1,71
25,25	27,7	5,93	3,3
	26,4	5,12	7,08
		5,18	
		6,6	
Ср. 24,93	23,4	6,17	3,87

Таблица 4

Активность декарбоксилазы в мозгу кроликов (в мг % ГАМК в 1 час при 37° С на 250 мг сырой ткани)

П-Ф + гл. к-та	Гл. к-та	Контроль
58,7	47,87	29,8
64,2	51,0	29,1
63,0	57,18	31,7
53,02	46,5	31,7
66,97	56,9	31,7
62,64	53,9	33,5
Ср. 64,7	52,23	31,2

При определении активности декарбоксилазы глютаминовой кислоты в мозговой ткани было установлено, что добавление к инкубированной среде пиридоксаль-5-фосфата (П-Ф) значительно повышает активность этого фермента (табл. 4). В то же время в опухолевой ткани нам, независимо от того, брали мы доброкачественную астроцитому или самую злокачественную опухоль этого ряда — мультиформную спонгиобластному, добавляли или не добавляли пиридоксаль-5-фосфат, установить наличие активности фермента не удалось. Все это позволяет думать, что ГАМК в процессе ее образования из глютаминовой кислоты связана в мозгу с жизнедеятельностью именно нервных клеток. Следует отметить, что косвенными путями к такому выводу приходят и другие исследователи. Кроме того, подтверждением этого вывода может служить еще и тот факт, что, как было показано Т. Т. Березовым (1), почти во всех исследованных им опухолях различной локализации активность декарбоксилазы глютаминовой кислоты, как правило, выше, чем в соответствующих здоровых тканях. А в опыте с опухолью молочной железы он установил присутствие активной декарбоксилазы в раковой опухоли молочной железы человека и отсутствие активности этого фермента в ткани доброкачественной опухоли молочной железы и в непораженной опухолью ткани. Хочется особенно подчеркнуть тот факт, что в ткани доброкачественной опухоли активность фермента была такой же, как и в ткани нормальной железы.

Мы, как уже отмечалось, исследовали ткань целого ряда опухолей мозга человека, кроликов и мышей: опухоли доброкачественные и с различной степенью дедифференциации до самых злокачественных, и ни в одном случае мы не наблюдали измеримой активности декарбоксилазы глютаминовой кислоты.

На основании сказанного мы пришли к выводу, что в глиальных клетках мозга нет ГАМК и процессы ее образования из глютаминовой кислоты в глии не имеют места. Эти данные подтверждают также и то, что декарбоксилирование глютаминовой кислоты является, вероятно, важнейшим путем образования ГАМК в нервной системе.

Исходя из положения о вероятной сопряженности процессов декарбоксилирования глютаминовой кислоты и трансаминирования между ГАМК и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, мы исследовали процесс переаминирования между этими кислотами в ткани глиальных опухолей мозга. Этими опытами была установлена некоторая активность фермента, оказавшаяся в опухоли намного ниже, чем в мозгу. Как следует из табл. 5, во всех исследованных опухолях процесс переаминирования между ГАМК и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотами протекает примерно в четыре раза медленнее, чем в мозгу. При этом активность трансаминазы не зависит от того, доброкачественна ли опухоль или злокачественна. Еще хотелось бы подчеркнуть одно, на наш взгляд представляю-

Таблица 5

Активность трансаминазы в нормальной и опухолевой ткани мозга мышей, кроликов и человека (на 1 гр. сырой ткани в 1 час при 37°C в мг гл. к-ты)

Мыши		Кролики	
Мозг	Опухоль	Мозг	Опухоль
2,50	0,80	2,44	0,50
2,20	0,85	2,17	0,47
2,05	0,70	2,30	0,48
2,60	0,94		
2,29	0,07	Человек	
1,92	0,04	Мозг	Опухоль
2,45	0,80		
2,20	0,50	1,35	0,25
2,62			0,70
			0,05
			0,42
			0,30
Ср. 2,31	0,59	1,35	0,35

шее интерес, положение о том, что в глиальной опухолевой ткани содержание глютаминовой кислоты такое же, как и в мозгу. С одной стороны, это может быть связано с тем, что фермент декарбоксилаза глютаминовой кислоты не активен, но, с другой стороны, и интенсивность процесса трансаминирования в системе ГАМК  $\rightarrow$   $\alpha$ -кетоглутаровая кислота очень мала, да и одного из субстратов этой реакции — ГАМК — в глиальной опухолевой ткани почти нет. Это дает основание думать, что глютаминовая кислота в этой ткани образуется преимущественно какими-то иными путями.

Хочется еще раз подчеркнуть положение о том, что изученные нами процессы и субстраты, в них участвующие, по полученным характеристикам одинаковы в глиальных опухолях доброкачественных и разной степени дедифференциации, до самых злокачественных. Это дает нам известное право считать, что полученные нами данные присущи нейроглии.

За представление экспериментального материала считаем приятным долгом выразить благодарность Л. Е. Яблоновской.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т., Хесмам В. М., Труды Университета дружбы народов им. Патриса Лумумбы, т. VII, 30, 1964.



## К ВОПРОСУ ОБ ОБМЕНЕ АЗОТИСТЫХ МЕТАБОЛИТОВ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ

Э. А. Гордиенко

Отдел возрастной физиологии и биохимии Института биологии Харьковского государственного университета, Харьков

Исследованию различных звеньев азотистого обмена в процессе пре- и постнатального развития организма человека и животных, находящихся на разных ступенях эволюционного развития, посвящено огромное число работ.

В общем балансе азотистого обмена организма в целом особый интерес представляет изучение его элементов в нервной ткани, в частности, веществ, участвующих в обмене аммиака, которые, по свидетельству большого числа исследований, участвуют в функциональной деятельности ЦНС. Как известно, на протяжении постнатального развития происходят значительные изменения функциональной деятельности ЦНС, ее регуляторных влияний на функции и обмен веществ отдельных органов и целого организма (1).

В основе этих изменений находятся, несомненно, количественные и качественные сдвиги метаболизма мозга, изученные к настоящему времени далеко не полно.

Данное экспериментальное исследование относится к числу тех работ, в которых изучаются конкретные звенья утилизации аммиака в тканях, в частности мозга. Для суждения об этих процессах определялись следующие показатели: преформированный аммиак, глютамин, амидный азот белков, активность глютамин-синтетазы (L-глютамат: аммиак-лигаза (АДФ) 6. 3. 1. 2) и фермента амидирования белков в условиях опытов *in vivo* (нагрузка солями аммония). Для выявления преимущественной локализации изменений изучаемых показателей на протяжении исследованного периода жизни крыс (30, 90, 360, 720 дней) эти вещества определялись в цитоплазматических фракциях — митохондриальной и надосадочной, включающей микросомы. Выбор цитоплазматической части клеток для исследования мотивировался как имеющимися данными о связи между обменными

процессами в элементах цитоплазмы и проявлением функциональной деятельности нервной ткани (2—4), так и сведениями о внутриклеточном распределении круга изучаемых нами веществ (5—8).

Следует отметить, что первая половина онтогенеза (от рождения до половозрелого возраста) исследована более полно, чем вторая половина, включающая старческое увядание организма, в отношении самых различных сторон обмена, в том числе и части из выбранных нами для определения показателей азотистого обмена мозга.

Так, в опытах Т. И. Дерябиной (9), проведенных на крысах (возраст от 1-го дня рождения до половозрелого возраста), В. А. Херувимовой (10), поставленных на кроликах и морских свинках (с 1-го по 30-й день от рождения) отмечена различная степень изменения преформированного аммиака в ткани мозга, нарастание глутамина, а в работе Т. И. Дерябиной сообщено и о снижении прироста глутамина в мозге половозрелых крыс по сравнению с молодыми после нагрузки.

В исследованиях Г. Велша (11), Г. Химвича и соавт. (12), О. Н. Барминой (13), Е. Робертса (14), С. Берл и Д. Пурпура (15), Э. А. Гордиенко (16), Е. В. Париной и В. П. Мищенко (17) к настоящему времени установлено, что к числу характерных изменений аминокислотного состава развивающегося мозга относится нарастание в период после рождения до половозрелого возраста уровня глутаминовой и гамма-аминомасляной кислот.

В более поздние периоды развития проведены исследования на печени и семенниках крыс (снижение синтеза глутамина после 180-дневного возраста, 18), печени и мышцах (нарушение использования АТФ на синтез глутамина у 720-дневных крыс, 19), печени, мышцах, мозге, почках (изменение уровня свободных аминокислот, 20, 21).

Учитывая важную роль принятых к определению показателей азотистого обмена в функциональной деятельности ЦНС, наличие данных о количественных сдвигах некоторых из них в различные, преимущественно ранние периоды онтогенеза (можно было полагать, что исследование более широкого комплекса веществ, участвующих в обмене аммиака, в тканях целого мозга и его цитоплазматических фракций в течение зрелого и позднего этапа постнатальной жизни), позволит получить новые сведения об изменении химизма мозга, сопоставимые со становлением и угасанием функциональной деятельности ЦНС в онтогенезе.

#### Постановка опытов и методика

Работа выполнена на белых крысах 30-, 90-, 360- и 720-дневного возраста.

Активность глутаминсинтетазы (L-глутамат: аммиака-лигаза (АДФ) 6. 3. 1. 2) и фермента амидирования белков мозга определялась в опытах

*in vivo* по приросту глутамина и амидного азота белков через 1 час после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , вводимого подкожно, в количестве 0,5 мг/г веса, по сравнению с содержанием этих веществ в мозгу контрольных животных. Поставлено 2 серии опытов. В первой глутамин и амидный азот белков у контрольных животных и у животных после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$  определялись на целом мозге после замораживания головы крысы *in situ* в жидком азоте.

Во второй серии опытов эти показатели определялись в митохондриальной и надосадочной (включающей микросомы) фракциях гомогената мозга.

Получение митохондриальной и надосадочной (включающей микросомы) фракций проводилось с помощью центрифуги ЦЛР-1. Гомогенат (мозг, измельченный в гомогенизаторе типа Эльвейра-Поттера в течение 40—60 сек, соотношение веса мозга и 0,25 М сахарозы 1 : 9) подвергался центрифугированию при 3 тыс. оборотах для осаждения ядер и частей клеток. Осадок дважды промывался 0,25 М раствором сахарозы и промывная жидкость присоединялась к надосадочной-I, полученной после первого центрифугирования. Надосадочная-I разделялась на митохондриальную (центрифугирование при 12 тыс. оборотов в течение 20 минут с последующей двукратной промывкой осадка) и надосадочную-II, содержащую микросомы.

Аликвотные части суспензии митохондрий и объема надосадочной использовались для определения в них содержания общего белка, глутамина и амидного азота белков. Общий белок фракций определялся по методу О. Лоури и соавт. (22). Преформированный аммиак до и после гидролиза глутамина и амидного азота белков (10 минут и 120 минут кипячения в 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  соответственно, 23, 24) определялся микродиффузионным методом (25) с учетом рекомендаций (26), предложенных при усовершенствовании этого метода для тканей.

Расчет определяемых показателей производился для целого мозга на сырой вес ткани, для цитоплазматических фракций — на сырой вес ткани и мг белка каждой фракции.

## Полученные результаты и их обсуждение

Как следует из данных, представленных на рис. 1, возрастные различия в уровне глутамина, особенно четко видимые при расчете на белок надосадочной фракции, сходны с изменениями

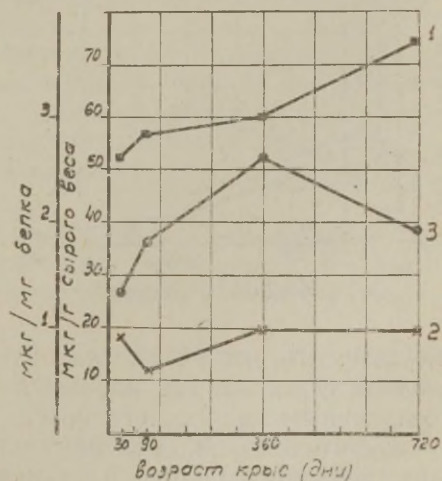


Рис. 1. Уровень глутамина целого мозга (мкг/г сырого веса) (1) митохондриальной (2) и надосадочной (включающей микросомы) (3) фракций мозга крыс разного возраста (мкг/мг белка).



величины этого показателя для целого мозга крыс 30-, 90- и 360-дневного возраста. У очень старых, 720-дневных крыс, количество глутамина в мозге, замороженном *in situ*, увеличено по сравнению с предыдущей возрастной группой; в надосадочной фракции — снижено.

Учитывая данные С. Оэриу (27) о резком повышении активности глутаминазы (L-глутамин-амидогидролазы, 3. 5. 1. 2) в мозге 720-дневных крыс, снижение содержания глутамина в надосадочной фракции, вероятно, объясняется более быстрым его распадом при подготовке мозга к дифференциальному центрифугированию у старых крыс по сравнению с более молодыми возрастными группами.

В митохондриальной фракции количество глутамина, не обнаруживая закономерных изменений, сходных с таковыми в надосадочной фракции или целом мозге, заметно снижено у крыс 90-дневного возраста по сравнению с 30- и 360-дневными животными.

Эта особенность уровня глутамина в митохондриальной фракции мозга крыс 90-дневного возраста, возможно, связана с более интенсивным его использованием в процессах переаминирования, максимум активности которых также отмечается в этот период (28).

При сопоставлении величин амидного азота белков целого мозга и отдельных фракций (рис. 2) крыс разного возраста мож-

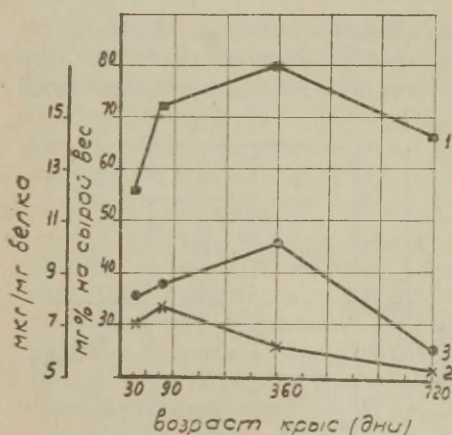


Рис. 2. Уровень амидного азота белков целого мозга (мг % на сырой вес) (1) в митохондриальной (2) и надосадочной (включающей микросомы) (3) фракциях мозга крыс разного возраста (мкг/мг белка).

но заметить, что возрастные изменения амидного азота надосадочной фракции, так же как и глутамина, сходны с таковыми, полученными для целого мозга.

В митохондриальной фракции мозга крыс 30-, 90- и 360-дневного возраста колебания величины амидного азота статистически

не достоверны. Но тенденция к уменьшению этого показателя у 360-дневных крыс по сравнению с 90-дневными перерастает в существенное различие у старых 720-дневных крыс.

Увеличение амидного азота белков можно рассматривать в связи с развитием и усложнением функциональной деятельности мозга взрослых животных. Амидирование белков мозга приводит к изменению их макроструктуры, о чем свидетельствует изменение их электрофоретической подвижности и интенсивности ультрафиолетового спектра поглощения (29). Изменения макроструктуры, приводящие к сдвигам в биохимической и биологической активности белков, возможно, связаны с активацией функциональной деятельности ЦНС зрелых животных.

Снижение амидного азота белков мозга у старых крыс может быть сопоставлено с наблюдениями об уменьшении по мере старения в мозге других функциональных групп ( $-\text{SH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ), что ставится автором, описавшим эти изменения (30), в связь с угасанием функциональной активности мозга в старческом периоде.

Таким образом, анализ раздела работы, в котором исследовалось распределение глутамина и амидного азота белков в цитоплазматических фракциях мозга крыс разного возраста, позволяет заключить, что, вероятно, основой обнаруживаемых количественных изменений этих веществ на целом мозге в течение постнатального развития крыс являются сдвиги в их содержании в надосадочной, включающей микросомы, фракции цитоплазмы.

Одной из конкретных причин возрастных изменений содержания глутамина и амидного азота белков мозга могут быть изменения активности ферментных систем, связанных с их превращениями в ткани мозга, зависящих как от состояния структуры, так и условий действия ферментов.

В наших опытах при определении активности глутаминсинтетазы (L-глутамат: аммиак-лигаза (АДФ), 6.3.1.2) и фермента амидирования белков, о которых судили по приросту глутамина и амидного азота белков мозга, замороженного *in situ*, и в цитоплазматических фракциях после введения  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , были получены следующие результаты.

Прирост глутамина в целом мозге (рис. 3), наибольший у крыс 30-дневного возраста, значительно снижается у 720-дневных крыс, свидетельствуя тем самым о падении глутаминсинтетазной активности.

В этих же условиях прирост глутамина наблюдался в надосадочной фракции мозга 30- и 90-дневных крыс и отсутствовал у крыс старших возрастов (рис. 3).

В митохондриальной фракции значимых величин прироста глутамина во всех возрастных группах получено не было.

Таким образом, снижение глутаминсинтетазной активности

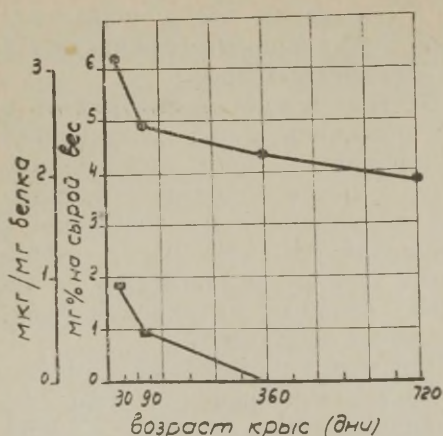


Рис. 3. Прирост глутамина (мг % на сырой вес) в целом мозге и надосадочной (включающей микросомы) (мкг/кг белка) крыс разного возраста после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

мозга крыс старших возрастных групп показывает, что увеличение глутамина в мозгу крыс с возрастом не может объясняться усиленным его синтезом, скорее это связано с торможением его участия в дальнейших синтетических реакциях.

Амидирование белков при выбранных условиях активации ферментной системы наблюдалось у крыс 30- и 90-дневного возраста, у 180-, 360- и 720-дневных животных величины амидного азота даже ниже цифр, наблюдаемых в контроле, или практически не изменены (табл. 1).

Таблица 1

Амидный азот белков мозга крыс в контроле и после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (мг % на сырой вес)

Возраст крыс (дни)	Контроль	Нагрузка	Значимость различия, P
1	$60,8 \pm 4,79$ (12)	$77,2 \pm 6,3$ (8)	$+16,4$ $P < 0,05$
3	$73,1 \pm 5,7$ (10)	$87,4 \pm 4,7$ (7)	$+14,3$ $0,05 < p < 0,1$
6	$82,3 \pm 5,7$ (11)	$78,4 \pm 5,7$ (9)	$-3,9$ $p > 0,1$
12	$79,2 \pm 7,3$ (10)	$69,3 \pm 4,7$ (9)	$-9,9$ $p > 0,1$
24	$67,5 \pm 3,6$ (13)	$70,1 \pm 5,0$ (8)	$+2,6$ $p > 0,1$



Вероятно, у молодых животных имеется большее количество свободных, не амидированных остатков глютаминовой и аспарагиновой кислот, которые блокируются с возрастом, чем объясняется увеличение амидного азота белков у крыс 90-, 180- и 360-дневного возраста (16). При использованной нами величине нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$  у молодых животных (30 и 90 дней жизни) резерв свободных остатков дикарбоновых аминокислот участвует в устранении введенного извне аммиака, что выявляется в увеличении амидного азота.

У животных зрелого и старших возрастов при данной дозе нагрузки амидирования тканевых белков выявить не удалось.

Сходная тенденция изменений амидного азота белков была отмечена и для надосадочной фракции мозга молодых и старых групп крыс. Однако, статистически эти различия как в расчете на сырой вес ткани, так и на мг белка фракции не значимы (рис. 4).

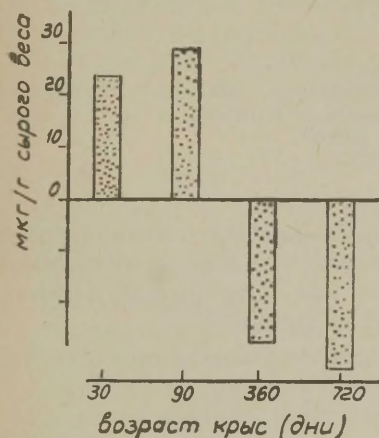


Рис. 4. Прирост амидного азота белков в надосадочной фракции мозга крыс разного возраста после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

В митохондриальной фракции происходит существенное увеличение амидного азота белков лишь у крыс 360-дневного возраста.

Снижение участия тканевых белков в устранении аммиака, несмотря на наличие токсических концентраций его в мозге (рис. 5) крыс старших возрастных групп, отмеченное в этой серии опытов, может иметь одной из своих причин изменение ферментной системы амидирования белков или условий ее действия по мере старения.

Эти данные, кроме того, позволяют думать, что состояние процессов детоксикации аммиака путем синтеза глютамина и амидирования белков, обнаруживаемых на целом мозге, определяются в основном их течением в надосадочной, включающей микросомы, фракции.

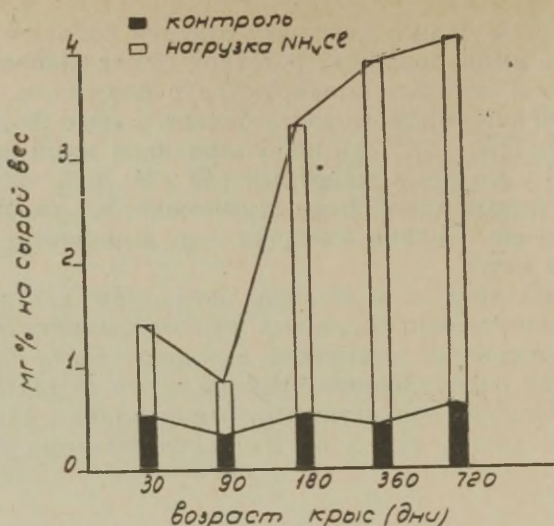


Рис. 5. Уровень преформированного аммиака в мозге крыс разного возраста в контроле и после нагрузки  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Это тем более правомерно, что, по имеющимся литературным данным (5, 6, 8), как глутаминсинтетаза, так и водорастворимые фракции белков, функционирующие как устранители аммиака (31), сосредоточены в основном в этой фракции.

Так как в наших опытах активность ферментов определялась по приросту конечных продуктов их деятельности (*in vivo*), то, естественно, «местные условия» действия ферментов в мозге крыс разного возраста могли существенно отличаться. Известной является зависимость интенсивности синтеза глутамина от энергетических ресурсов ткани.

В условиях нагрузки течение процессов образования и использования АТФ могло быть различным в мозге молодых (30, 90 дней жизни) и старших возрастных групп (360, 720 дней жизни), и одной из причин этого могло быть гораздо большее увеличение преформированного аммиака (рис. 5) в мозге крыс старших возрастных групп.

В связи с этим возможна различная степень нарушения окислительных процессов, которые существенно подавляются, согласно работам У. С. Тарве (32, 33), Мак-Канна и соавт. (34), М. Тайора и соавт. (35), в присутствии избытка аммиака и, следовательно, при уменьшении содержания АТФ и креатинфосфата. Таким образом, конкретные причины снижения активности

глютаминсинтетазы, отмеченные в данной постановке опытов, требуют дополнительных исследований о состоянии фермента и об условиях его действия в опытах как *in vivo*, так и *in vitro*.

Однако резкое снижение синтетических реакций связывания экзогенного азота в мозге, выявленное в данных опытах, может объясняться не только «местными причинами» (изменением количества субстратов, снижением активности ферментных систем, нарушением использования АТФ на синтетические реакции и др.), но и перестройкой сложных регуляторных и приспособительных механизмов в процессе онтогенеза.

Сведения о значительных изменениях в процессе старения функций гипоталамической области, важнейшего регулирующего центра системы гипоталамус-гипофиз-кора надпочечников, т. е. структур, регулирующих освобождение АКТГ, в сочетании с данными об изменении степени амидирования белков под влиянием различных доз АКТГ (36), могут быть использованы уже как прямое подтверждение необходимости изучения, наряду с количественными изменениями обменных процессов в онтогенезе, регуляторных и гормональных воздействий, влияющих на эти процессы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Нагорный А. В., Никитин В. Н., Буланкин И. Н., Проблема старения и долголетия. Медгиз, М., 123—172, 449—480, 1963.
2. Панченко Л. Ф., Боголепов Н. Н., Доклады АН СССР, **160**, 1401—1403, 1965.
3. Португалов В. В., Доведова Е. Л., Серебницкий В. Г., 1-я конференция по вопросам цито- и гистохимии, 80, М., 1960.
4. Певзнер Л. З., Цитология, **7**, № 2, 253, 1965.
5. Tower D., Proc. 4-th Internat. congress Biochem., Vienna, 1958, Symposium III, Biochem. Centr. nervous system, Pergamon Press, 213—250, 1959.
6. Waelsch H., Ibid., 36—45.
7. Палладин А. В., Полякова Н. М., Малышева М. К., Доклады АН СССР, **134**, № 5, 1236—1239, 1960.
8. Sellinger O. Z., Verter F., J. Biol. Chem., **237**, 2836—2844, 1962.
9. Дерябина Т. И., Некоторые возрастные особенности химизма мозга, Автореферат диссертации на соискание учен. степени канд. биол. наук, Пермь, 1957.
10. Херувимова В. А., Укр. биох. ж-л, № 2, 230, 1962.
11. Waelsch H., Advances in Protein Chemistry, **6**, 308, 1951.
12. Himwich H. E., Himwich W., Galesburg Ph., J. of chronic Diseases, **3**, 5, 1956.
13. Бармина О. Н. Материалы II Поволжской конференции физиологов, биохимиков и фармакологов с участием морфологов и клиницистов. Изд-во Казанского университета, 54, 1961.
14. Roberts E., Chem. Pathol. Nervous System, Pergamon Press, 378—386, 1961.
15. Berl S., Purpura D. P., J. Neurochem., **10**, № 4, 237—240, 1963.
16. Гордиенко Э. А., Материалы симпозиума по основным проблемам возрастной физиологии и биохимии. Изд-во Харьковского университета, 121—125, 1965.



17. Парина Е. В., Мищенко В. П., Тези доповідей I Укр. біохімічного з'їзду. Видавництво «Наукова думка», Київ, 301, 1965.
18. Reines J. M., Hudson P. B., J. Urol., 70, 4, 627, 1959.
19. Никитин В. Н., Голубицкая Р. И., Труды научно-исслед. ин-та биологии ХГУ им. А. М. Горького, 21, 113, 1954.
20. Парина Е. В., Материалы симпозиума по основным проблемам возрастной физиологии и биохимии, Харьков, 22—34, 1965.
21. Мищенко В. П., там же, 127—131.
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
23. Speck J., J. Biol. Chem., 168, 403, 1947.
24. Эпштейн С. Ф., Укр. биох. ж-л, XX, № 3, 332—340, 1948.
25. Brown R. H., Duda Y., Korkes S., Handler Ph., Arch. Biochem. Biophys., 66, 2, 301, 1957.
26. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А., Вопр. мед. химии, 8, № 5, 538—544, 1962.
27. Оэриу С., Костеску Г., Теодореску О., Укр. биохим. ж., № 2, 163. 1963.
28. Никитин В. Н., Голубицкая Р. И., Дрючина А. И., Семенова З. Л., Тр. конференции по возрастным изменениям обмена веществ и реактивности организма, Киев, 17—26, 1951.
29. Тяхепыльд Л. Я., Труды I Биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии, посвящ. 20-летию Латвийской, Литовской и Эстонской советских социалистических республик, 1960, Тарту, 51, 1961.
30. Узбеков Г. А., Труды Московского об-ва испытателей природы. Отдел биол., 6, 100—106, 1962.
31. Клейн Е. Э., Тр. ин-та физиологии АН Груз. ССР, XIII. Издательство АН Груз. ССР, Тбилиси, 173—180, 1963.
32. Тарве У., Ученые записки Тартуского ун-та, вып. 112, 115—159, 1961.
33. Тарве У. С., Сборник: Вопросы клинической неврологии и психиатрии, 1, 252—260, Тарту, 1962.
34. McKhann, Guy M., Tower D., Amer. J. Physiol. 200, No. 3, 420—424, 1961.
35. Tuor M. P., Wilson W. P., J. Lab. a. clin. Med., 51, No. 4, 592—599, 1958.
36. Тяхепыльд А. К., Ученые записки Тартуского ун-та, вып. 163, 142—148, 1964.

## МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКА В НЕЙРОНАХ И НЕЙРОГЛИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Л. З. Певзнер

Лаборатория функциональной нейрoхимии Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

За более чем 25-летний период после опубликования Хиденом (1) первой работы по количественной цитохимии нервных клеток было проведено уже много подобных исследований нервной системы. При этом основное внимание исследователей было уделено нейронам — ведущим функциональным элементам нервной ткани. Обширная литература по данному вопросу, суммированная в ряде обзоров (2—6), однозначно свидетельствует о том, что повышенная функциональная активность нейронов сопровождается, как правило, усилением процессов синтеза и нуклеиновых кислот, и белков в теле возбужденных нервных клеток.

Казалось бы, что субстратом этих синтетических реакций должны служить те низкомолекулярные соединения, которые проникают в тело нейрона непосредственно из кровеносного русла. Однако наружные мембраны нервных клеток, как показали электронномикроскопические данные многих авторов (см. 7—10), почти нигде не соприкасаются с эндотелием капилляров мозга: они разделены в основном клетками нейроглии. Естественно возник вопрос о том, не могут ли глиальные клетки принимать активное участие в обменных процессах, протекающих в теле нейрона.

Поэтому за последние годы объектом исследования нейрoхимиков все чаще становятся именно клетки нейроглии. Сочетание биохимических (2, 3, 15—19) и количественных цитохимических методов (20—22) позволило выявить некоторые особенности метаболизма нейроглии по сравнению с метаболизмом нейронов. Тем не менее вопрос о конкретных биохимических путях участия нейроглии в функционально обусловленных изменениях метаболизма нейронов все еще очень далек от разрешения.

Целью нашего исследования явилось сопоставление изменений содержания нуклеиновых кислот и белков в нейронах и нейроглии при различных воздействиях, изменяющих функциональное состояние нервной системы. При этом мы исследовали лишь те глиальные клетки-сателлиты, которые непосредственно прилежали к наружной мембране тела нейрона.

### Методика

Опыты проводили на кошках весом 2,5—3,0 кг и белых крысах весом 180—210 г. Соответствующие участки нервной системы крыс (мозжечок, спинной мозг) извлекали после обезглавливания животных без наркоза; верхний шейный симпатический ганглий кошек вырезали под уретановым наркозом (уретан вводили внутривентрально в дозе 1,2 г/кг веса животного).

Извлеченные объекты немедленно погружали на 1—1,5 часа в охлажденную фиксирующую смесь Бродского (формалин-этанол-уксусная кислота в соотношении 3:1:0,3) с последующей заливкой в парафин. В срезах толщиной 7—10 мк определяли содержание нуклеиновых кислот в нервных и глиальных клетках методом двухволновой ультрафиолетовой цитоспектрофотометрии; принципы метода, схема ультрафиолетового цитоспектрофотометра описаны Л. С. Агроскина, детали определения и расчета содержания нуклеиновых кислот описаны ранее (4, 23—25). Содержание плотных веществ (в фиксированных клетках отражающее в основном суммарное содержание белков), определяли при помощи микроинтерферометрии на макете интерференционно-поляризационного микроскопа МБИИ-3 с ширинг-объективом  $40\times 0,65$  и величиной раздвоения 150 мк; детали определения и расчета содержания плотных веществ описаны нами ранее (26).

Весь полученный цифровой материал обрабатывали статистически по Стьюденту-Фишеру.

### Результаты

Для анализа отличий в метаболизме нейронов и нейроглии было проведено 5 основных серий экспериментов, в которых различными способами изменяли функциональное состояние нервной системы подопытных животных.

Влияние 6-меркаптопурина. Молодым крысам весом 100—120 г вводили подкожно 0,5 мг 6-меркаптопурина в сутки в виде 0,05% раствора в 1% соде. Раствор вводили ежедневно, в течение 4 дней; контролем служили крысы того же пола, получавшие инъекции одной лишь соды. Как видно из рис. 1, концентрация РНК в цитоплазме клеток Пуркиньи мозжечка заметно снизилась, в глиальных же клетках мозжечка достоверных сдвигов в содержании нуклеиновых кислот выявлено не было.

Меркаптопурин, будучи антиметаболитом пуриновых оснований, угнетает синтез нуклеиновых кислот. Это действие отчетливо проявляется лишь при длительном ежедневном введении препарата: по фармакологическим рекомендациям — до одного месяца (27). Полученные нами данные свидетельствуют, по-ви-



Рис. 1. Влияние 6-меркаптопурина на содержание нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии мозжечка крыс.

*Н* — нейроны (клетки Пуркинье, цитоплазма), *Г* — глия (клетки-сателлиты); 1 — введение ежедневно в течение 4-х дней по 1 мл 1% р-ра соды; 2 — введение ежедневно в течение 4-х дней по 0.5 мг 6-меркаптопурина в 1 мл 1% р-ра соды. По оси ординат — концентрация нуклеиновых кислот в %.

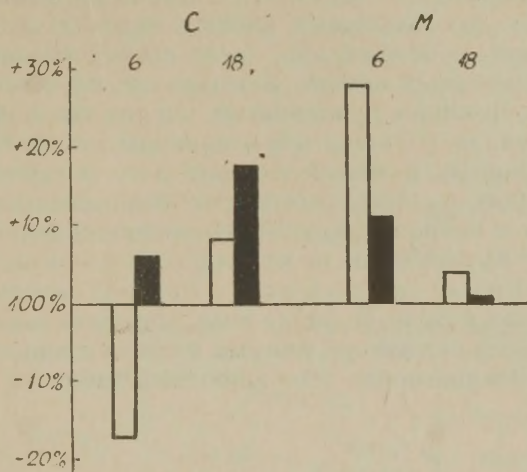
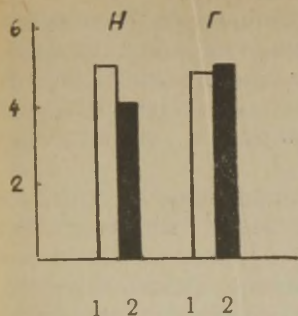


Рис. 2. Изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии спинного мозга и мозжечка крыс в постгипоксический период.

*С* — спинной мозг (двигательное ядро передних рогов), *М* — мозжечок (слой клеток Пуркинье); 6 и 18 — время в часах после извлечения крыс из барокамеры. Белые столбики — нейроны (цитоплазма), черные — нейроглия. По оси ординат — отклонения в процентах от соответствующих величин (принятых за 100%) концентрации исследуемых веществ у контрольных животных.

димому, о большей чувствительности метаболизма нуклеиновых кислот в нервных клетках к действию подобного антиметаболита по сравнению с глиальными.

**Постгипоксическая репарация.** Как полученные нами, так и литературные данные (см. 4—6), убеждают в том, что острая гипоксия быстро сдвигает равновесие между катаболизмом и анаболизмом нуклеиновых кислот в нервной ткани, обратимо угнетая синтез нуклеиновых кислот (преимущественно РНК). С целью изучения последующей репарации, мы опреде-

ляли содержание нуклеиновых кислот в различных отделах нервной системы у крыс через 6 и 18 час. после острой гипоксии. Острую гипоксию вызывали, выдерживая животных 2 часа в барокамере \* на «высоте» около 8,7 км (давление воздуха 240 мм рт. ст., парциальное давление  $O_2$  50 мм рт. ст., содержание  $O_2 \approx 6,6\%$ ).

Как видно из рис. 2, через 6 час. после извлечения крыс из барокамеры, концентрация РНК в цитоплазме мотонейронов спинного мозга оставалась еще немного сниженной, а через 18 час. возвращалась к нормальному уровню и даже несколько превышала его (хотя это превышение, звиду недостаточно большого числа измерений, оказалось статистически недостоверным). В окружающих же глиальных клетках-сателлитах через 18, в меньшей степени — через 6 час., было выявлено повышение содержания нуклеиновых кислот. В мозжечке это компенсаторное повышение содержания нуклеиновых кислот было более отчетливым и наступало раньше, чем в спинном мозгу. Через 6 час. в клетках Пуркинье, в меньшей степени — в глиальных клетках, концентрация нуклеиновых кислот была повышенной, а через 18 час. как в нейронах, так и в нейроглии содержание нуклеиновых кислот практически не отличалось от нормального.

**Коразоловые судороги.** Коразол вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 45 мг/кг веса животного. Судороги наступали в течение первой же минуты после введения коразола и длились 15—20 мин., после чего животных забивали.

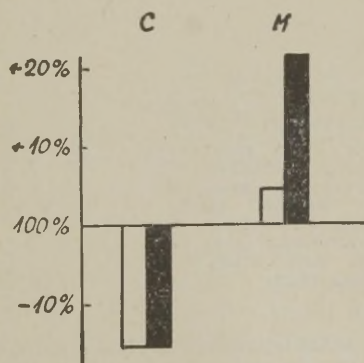


Рис. 3. Изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии спинного мозга и мозжечка крыс после коразоловых судорог.

Обозначения — те же, что и на рис. 2.

Как видно из рис. 3, в цитоплазме мотонейронов передних рогов спинного мозга и в глиальных клетках-сателлитах этих нейронов концентрация нуклеиновых кислот снижалась. По-видимому, это снижение можно рассматривать как относительно специфическую реакцию на истощающее влияние судорог: в

\* Пользуюсь возможностью выразить искреннюю признательность С. В. Гастевой и Л. Н. Антонову за помощь в проведении опытов с барокамерой.

клетках Пуркинью мозжечка этих же крыс достоверных изменений содержания цитоплазматической РНК не было выявлено. В глиальных клетках-сателлитах мозжечка отмечено некоторое повышение содержания нуклеиновых кислот; дать объяснение этому факту в настоящее время нам не представляется возможным.

Электростимуляция ганглия. Преганглионарный ствол верхнего шейного симпатического ганглия кошек, находящийся в состоянии уретанового наркоза, раздражали супрамаксимальным электрическим током частотой 300 имп/сек; физиологическая часть постановки этих опытов детально описана ранее (28). Столь большая длительность раздражения ганглия была связана с относительно низкой скоростью сдвигов в содержании нуклеиновых кислот в клетках ганглия. Так, в предварительных опытах, проведенных совместно с В. А. Брумберг и Ю. П. Пушкаревым, было показано, что стимуляция нейронов ганглия антидромными импульсами в течение 30—45 мин., до стойкого снижения биопотенциалов ганглия, еще не вызывала каких-либо достоверных изменений в концентрации нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии ганглия (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация нуклеиновых кислот в клетках верхнего шейного симпатического ганглия кошки при утомлении нейронов ганглия антидромными импульсами

Состояние клеток ганглия	Нейроны		Нейроглия	
	Число клеток	Конц-ия цитоплазм. РНК (в %)	Число клеток	Конц-ия нукл. к-т (в %)
Покой	257	4,7	188	3,0
Утомление	242	4,7	190	3,2

Трехчасовая стимуляция ганглия приводила к отчетливому повышению количества нуклеиновых кислот и белков (в расчете на одну клетку) в цитоплазме нейронов ганглия (рис. 4). В нейроглии ганглия содержание нуклеиновых кислот, напротив, понижалось. Это позволило нам предположить, что синтез нуклеиновых кислот в возбужденном нейроне на заключительных стадиях его повышенной функциональной активности связан с непосредственным участием нейроглии. Не исключено, что нуклеиновые кислоты глиальных клеток посредством пиноцитоза, как полагает Хиден (2, 3, 19), могут переходить в тело нейрона.

Отсюда было логично сделать заключение, что факторы, снижающие или предупреждающие развитие утомления нервных



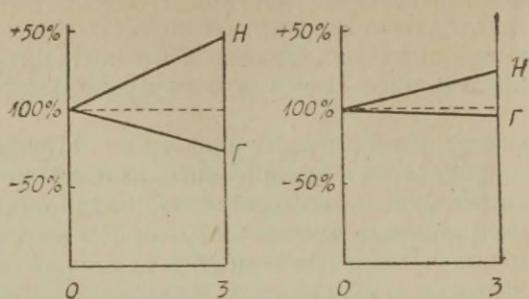


Рис. 4. Изменения содержания нуклеиновых кислот и белка в нейронах и нейроглии верхнего шейного симпатического ганглия кошки после 3-часовой электростимуляции ганглия.

Н — нейроны (цитоплазма), Г — глия, НК — нуклеиновые кислоты, Б — суммарный белок. По оси абсцисс — длительность стимуляции ганглия (в час.). По оси ординат — то же, что и на рис. 2.

клеток, должны воздействовать прежде всего на метаболизм нейроглии. Для проверки этого предположения была проведена серия опытов с длительным введением животным адреналина в малых дозах.

**Влияние адреналина.** Кошкам и крысам ежедневно вводили адреналин подкожно в дозе соответственно 60 и 30 мкг на животное. Инъекции проводили один раз в сутки, в течение 14 дней; существенных изменений поведения и веса животных при этом не отмечено. Животных забивали через 1—2 часа после последней инъекции.

Как видно из рис. 5, в нейронах двигательных и симпатических ядер спинного мозга крыс изменения в концентрации цитоплазматической РНК после таких инъекций адреналина были неоднотипными, тогда как в глиальных клетках-сателлитах, окружающих эти нейроны, было четко показано выраженное повышение концентрации нуклеиновых кислот. Отчетливое увеличение содержания как нуклеиновых кислот, так и белков в расчете на одну клетку было найдено при этом и в нейроглии верхнего шейного симпатического ганглия кошки (рис. 6). В нейронах же ганглия достоверных сдвигов в общем количестве этих веществ под влиянием адреналина не выявлено.

С целью более детального анализа эффекта адреналина на метаболизм РНК в структурах ганглия была применена разработанная нами совместно с В. А. Брумберг (29) методика последовательной экстракции нуклеиновых кислот из срезов нерв-

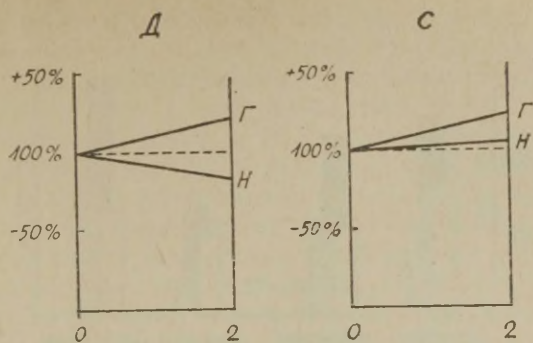


Рис. 5. Изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии спинного мозга крыс после двухнедельного введения адреналина.

Д — двигательное ядро передних рогов, С — симпатическое ядро боковых рогов. По оси абсцисс — длительность введения адреналина (в неделях). Прочие обозначения — те же, что и на рис. 4.

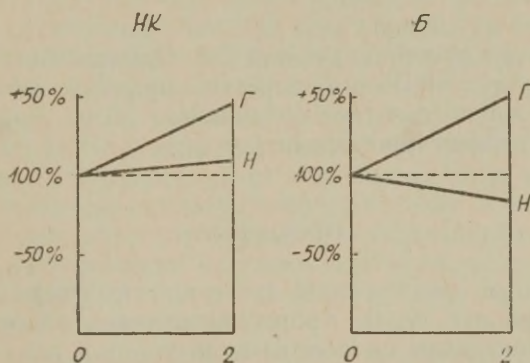


Рис. 6. Изменения содержания нуклеиновых кислот и белка в нейронах и нейроглии верхнего шейного симпатического ганглия кошки после двухнедельного введения адреналина.

По оси абсцисс — то же, что и на рис. 5. Прочие обозначения — те же, что и на рис. 4.

ной ткани. Определяли содержание суммарной РНК, а также двух ее фракций: 1-й — извлекаемой и 2-й — неизвлекаемой из клеток в результате 18-часовой обработки срезов 16%  $\text{HClO}_4$  при  $0-4^\circ\text{C}$ . Как видно из рис. 7, адреналин влиял на распределение фракций в нейронах и глии ганглия весьма сходно: соотношение фракций становилось почти равным, тогда как в норме 1-я фрак-

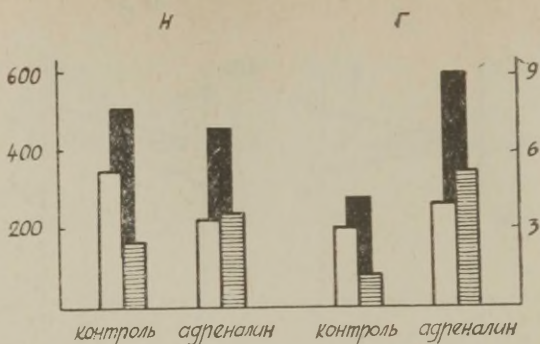


Рис. 7. Влияние двухнедельного введения адреналина на содержание различных фракций РНК в нейронах и нейроглии верхнего шейного симпатического ганглия кошки.

Белые столбики — фракция РНК, извлекаемая 18-часовой обработкой 16%  $\text{HClO}_4$  при  $0-4^\circ\text{C}$ ; заштрихованные столбики — фракция РНК, не извлекаемая такой обработкой; черные столбики — суммарная РНК. По оси ординат — количество РНК (в расчете на одну клетку) в пг ( $\text{пг} = 10^{-6}$  мкг). Прочие обозначения — те же, что и на рис. 4.

ция значительно преобладала над 2-й. Однако в нейронах содержание суммарной РНК в цитоплазме практически не менялось, в нейроглии же абсолютное содержание обеих фракций (в особенности 2-й) отчетливо повышалось.

## Обсуждение

Приведенный фактический материал подтверждает предположение, наиболее полно сформулированное впервые Хиденом (2, 3), о тесной связи метаболизма нервных и глиальных клеток в ходе функционирования нейронов.

Так, при длительных коразоловых судорогах, вызывающих перевозбуждение, истощение двигательных нейронов, было выявлено отчетливое снижение содержания нуклеиновых кислот как в нейронах, так и в нейроглии двигательных ядер спинного мозга. Многочисленные биохимические и цитохимические литературные данные (см. 4—6) указывают на то, что снижение содержания нуклеиновых кислот в нервной ткани является четким показателем торможения или утомления в нервной системе. Одинаковая направленность изменений в содержании нуклеиновых кислот в нейронах и нейроглии (рис. 3) убедительно свидетельствует, по нашему мнению, о том, что процесс генерализованного перевозбуждения и истощения в данном случае захватывает как



двигательные нейроны, так и окружающие их глиальные клетки. То, что выявленные химические изменения связаны со специфическими сдвигами функционального состояния соответствующих отделов нервной системы, подтверждается отсутствием аналогичного снижения одновременно и в клетках мозжечка.

Острая гипоксия является излюбленным экспериментальным приемом при анализе метаболизма целого ряда соединений, в особенности нуклеиновых кислот, поскольку синтез последних через пентозный цикл тесно связан с процессами аэробноза. Как было показано в наших исследованиях (23, 24), острая аноксическая гипоксия уже через час приводила к значительному снижению содержания цитоплазматической РНК в нейронах коры головного мозга. Аналогичные данные были получены и другими авторами, определявшими содержание нуклеиновых кислот как в гомогенате нервной ткани, так и в отдельных нейронах (литературу см. в 4). Если же такая гипоксия, несмотря на вызываемые ею существенные нарушения метаболизма, не является гибельной для подопытного животного, то по ее прекращении функциональная активность нервных клеток восстанавливается. Это восстановление сопровождается компенсаторным усилением синтеза нуклеиновых кислот, что очевидно может приводить не только к восстановлению исходного уровня их содержания, но и к временному превышению его. По всей видимости, именно такое явление мы и наблюдали в клетках спинного мозга и мозжечка через различные сроки после извлечения крыс из барокамеры (рис. 2).

В то же время ход этих репаративных синтетических процессов в нейронах и нейроглии не полностью совпадал. Есть основания полагать, что синтезирующие системы в нейроглии отличаются большей резистентностью к неблагоприятным воздействиям. Это предположение частично подтверждается и данными по влиянию меркаптопурина — специфического ингибитора синтеза нуклеиновых кислот (рис. 1).

Интерпретация данных по влиянию какого-либо фактора на целый организм всегда затруднительна ввиду сочетания ряда механизмов как первичного ответа на действие этого фактора, так и вторичной, компенсаторной реакции. Кроме того, высшие отделы нервной системы, в силу большого числа сложно взаимодействующих нервных цепей, трудны для оценки функционального состояния их нейронов. Поэтому нам представлялся целесообразным анализ взаимоотношения метаболизма в нейронах и нейроглии на таком относительно простом объекте, как верхний шейный симпатический ганглий.

Нейроны вегетативной нервной системы характеризуются рядом функциональных особенностей (длительностью функционирования без явлений утомления, избирательной чувствительностью к определенным медиаторам и т. д.), которым несомненно

должны соответствовать и определенные особенности метаболизма. Так, исследованный нами шейный ганглий — одно из немногих образований нервной ткани, в которых не обнаружена ГАМК (30).

Результаты расчета абсолютного содержания нуклеиновых кислот и белков в нейронах и нейроглии шейного симпатического ганглия показали (табл. 2), что содержание нуклеиновых кислот

Таблица 2

Содержание нуклеиновых кислот и белков в клетках верхнего шейного симпатического ганглия кошки

Клетки ганглия		Концентрация (в пг/мк <sup>3</sup> )		Объем (в мк <sup>3</sup> )	Содержание в расчете на одну клетку (в пг)	
		белков	нукл. к-т		белков	нукл. к-т
Нейроны	цитоплазма	0,20	0,030	5650	1080±74	165±12
	ядро	0,20	0,025	590	125±5	15±2
Клетки нейроглии		0,22	0,054	150	35±3	8,2±0,5

в ядрах нейронов ганглия равно в среднем 15, а в ядрах глиальных клеток — 8 пг. С учетом присутствия диффузно распределенной ядерной РНК в нейронах и как ядерной, так и цитоплазматической РНК в нейроглии можно сделать вывод, что основную массу глиальных клеток ганглия составляют клетки с диплоидными ядрами, тогда как среди нейронов преобладают клетки с полиплоидными ядрами. Это согласуется с последними данными В. Я. Бродского и сотр. (6, 31), полученными, в частности, на шейном симпатическом ганглии кролика с помощью цитотометрии препаратов, окрашенных по Фельгену.

Из табл. 2 видно также, что основная масса белков в нейронах ганглия локализуется в цитоплазме. По представлениям В. Я. Бродского (6), такие нейроны относятся к цитоплазматическому типу синтеза белка, т. е. на повышенную функциональную нагрузку они реагируют интенсивным синтезом белка прежде всего в цитоплазме. Действительно, электростимуляция этого ганглия приводила, как показано нами ранее (32), к повышению содержания цитоплазматических белков, не влияя существенным образом на содержание белков в ядре симпатических нейронов. На основании данных, полученных в настоящей работе, можно заключить, что этот интенсивный синтез в нейронах тесно связан с метаболизмом нуклеиновых кислот в глиальных клетках. По-



видимому, на последних стадиях процесса возбуждения синтез нуклеиновых кислот в нейроне уже не может обеспечиваться соответствующими системами самого нейрона и часть нуклеиновых кислот нейроглии переходит в цитоплазму нейрона.

Детальное рассмотрение этого взаимоотношения привело нас к убеждению (22), что именно нейроглия является местом приложения трофических влияний на нервную систему. Учитывая давнее положение Л. А. Орбели (33) об адаптационно-трофической роли симпатической нервной системы, мы попытались имитировать это трофическое влияние симпатической нервной системы путем ежедневных инъекций животным в течение 2 недель адреналина в малых дозах. Хотя медиатором симпатической нервной системы в основном является норадреналин, а не адреналин, последний влияет на процессы метаболизма в тканях в несколько раз сильнее, чем норадреналин (34). Как показали результаты определений (рис. 5 и 6), наиболее постоянный эффект адреналина на метаболизм нуклеиновых кислот в различных отделах нервной системы проявлялся именно в глиальных клетках. В то же время в нейронах выявлены физико-химические изменения в рибонуклеопротеидных комплексах: снижение содержания рыхло связанных и повышение содержания прочно связанных с клеточными белками рибонуклеиновых кислот (рис. 7). В нейроглии же наряду с аналогичными физико-химическими сдвигами отмечены и биохимические изменения: под влиянием адреналина исходное равновесие между катаболизмом и анаболизмом нуклеиновых кислот сдвигалось в сторону преобладания синтеза этих соединений.

## Выводы

1. Четырехдневное введение крысам ежедневно по 0,5 мг антиметаболита нуклеиновых кислот (6-меркаптопурина) вызывало снижение содержания цитоплазматической РНК в клетках Пуркинье мозжечка, не влияя на содержание нуклеиновых кислот в окружающих эти нейроны глиальных клетках-сателлитах.

2. После двухчасового пребывания крыс в барокамере на «высоте» 8700 м измененное содержание нуклеиновых кислот в мотонейронах передних рогов спинного мозга и клетках Пуркинье мозжечка, а также в соответствующих глиальных клетках восстанавливалось в течение первых суток; скорость этого восстановления была неодинаковой в зависимости от конкретного вида клеток.

3. Коразоловые судороги в течение 15—20 мин. приводили к снижению содержания нуклеиновых кислот как в нейронах, так и в нейроглии двигательных ядер спинного мозга крыс; в клетках Пуркинье мозжечка содержание цитоплазматической



РНК не менялось, в глиальных же клетках количество нуклеиновых кислот несколько увеличивалось.

4. Электростимуляция верхнего шейного симпатического ганглия кошки в течение 3 час. повышала содержание цитоплазматической РНК в нейронах ганглия, снижая содержание нуклеиновых кислот в нейроглии.

5. Подкожное введение кошкам ежедневно в течение 2 недель по 60 мкг адреналина не влияло на общее содержание цитоплазматической РНК в нейронах ганглия, изменяя соотношения фракций этой РНК, отличающихся по прочности связи с клеточными белками; в нейроглии ганглия сдвиги в соотношении этих фракций были в целом такими же, как и в нейронах, но сопровождалась отчетливым повышением абсолютного содержания РНК в обеих фракциях.

6. Системы биосинтеза нуклеиновых кислот и белка в нейроглии, по-видимому, более устойчивы по сравнению с аналогичными системами в нейронах к различным неблагоприятным, стрессорным воздействиям, что в значительной мере и обуславливает, вероятно, вторичную, вспомогательную роль нейроглии в функционировании единой метаболической системы нейрон-нейроглии. В то же время именно метаболизм нейроглии является, очевидно, местом приложения трофических влияний на нервную систему.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hydén H., *Acta physiol. scand.*, **6**, suppl. 17, 1943.
2. Hydén H., *The Cell*, **4**, 215, 1960.
3. Hydén H., In: *Neurochemistry*, Springfield, Ill., 331, 1962.
4. Певзнер Л. З., *Укр. біохім. журн.*, **35**, 448, 1963.
5. Pevzner L. Z., In: *Macromolecules and Behavior*, New York, 43, 1966.
6. Бродский В. Я., *Трофика клетки*. «Наука», М., 1966.
7. Luse S. A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 531, 1956.
8. Luse S. A., *Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis.*, **15**, 1, 1962.
9. De Robertis E., Gerschenfeld H. M., *Intern. Rev. Neurobiol.*, **3**, 1, 1961.
10. Жаботинский Ю. М., *Нормальная и патологическая морфология нейрона*, «Медицина», Л., 1965.
11. Abood L. G., Gerard R. W., Banks J., Tschirgi R. D., *Amer. J. Physiol.*, **168**, 728, 1952.
12. Korey S. R., Orchen M., *J. Neurochem.*, **3**, 277, 1959.
13. Промыслов М. Ш., В сб.: *Первый Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов*, **1**, 110, 1963.
14. Промыслов М. Ш., Андреева Т. В., см. настоящий сб., стр. 94.
15. Lowry O. H., Roberts N. R., Chang M.-L. W., *Biol. Chem.*, **222**, 97, 1956.
16. Giacobini E., *J. Neurochem.*, **9**, 169, 1962.
17. Giacobini E., In: *Morphological and Biochemical Correlates of Neural Activity*, New York, 15, 1964.
18. Hydén H., In: *The effect of use and disuse on neuromuscular function*, Prague, 184, 1963.
19. Hydén H., *Rec. Adv. Biol. Psychiat.*, **6**, 31, 1964.

20. Певзнер Л. З., Доклады АН СССР, 156, 1213, 1964.
21. Певзнер Л. З., В сб.: Морфология путей и связей центральной нервной системы, «Наука», М.-Л., 135, 1965.
22. Pevzner L. Z., J. Neurochem., 12, 998, 1965.
23. Певзнер Л. З., Научн. сообщ. Инст. физиол. им. И. П. Павлова АН СССР, 2, 198, 1959.
24. Певзнер Л. З., В сб.: 3-я Всес. конференция по биохимии нервной системы, Ереван, 327, 1963.
25. Певзнер Л. З., Укр. біохім. журн., 38, 123, 1966.
26. Певзнер Л. З., Коваль В. А., Кучин А. А., Цитология, 6, 84, 1964.
27. «6-меркаптопурин», Военно-медиц. журн., № 4, 95, 1959.
28. Баранов М. Н., Певзнер Л. З., Биохимия, 28, 958, 1963.
29. Брумберг В. А., Певзнер Л. З., Цитология, 8, 437, 1965.
30. Roberts E., In: Inhibition of the Nervous System and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid, London, 144, 1960.
31. Куш А. А., Ярыгин В. Н., Цитология, 7, 228, 1965.
32. Певзнер Л. З., Цитология, 7, 253, 1965.
33. Орбели Л. А., Лекции по физиологии нервной системы. Медгиз, М.-Л., 1938.
34. Матлина Э. Ш., Меньшиков В. В., Проблемы эндокринологии, 11, № 4, 113, 1965.

## О ПРОНИКНОВЕНИИ $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР И ЕЕ РОЛЬ В ОБМЕНЕ НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ МОЗГА

Г. Х. Бунятян, Б. А. Казарян, Э. А. Гулян

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

Относительно роли  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в функциональной деятельности головного мозга проведены многочисленные исследования, свидетельствующие о ее разносторонней роли в обменных процессах ЦНС.

Имеется ряд указаний о том, что ГАМК, введенная различными путями, проявляет тормозящее действие на ЦНС (1). Наряду с этим ряд исследователей находит, что ГАМК у взрослых животных не проникает через гемато-энцефалический барьер (2, 3), о чем судят главным образом по изменению уровня ее свободной формы в целом мозгу.

Наши предыдущие исследования показали, что ГАМК, введенная интраперитонеально, оказывает определенное действие на углеводный обмен в периферических органах, причем это действие осуществляется через ЦНС (4, 5). Любопытно то, что подобный эффект ГАМК проявляет также при ее непосредственном введении в гипоталамическую область (6).

Исходя из этого, мы поставили перед собой задачу изучить вопрос о проникновении ГАМК через гемато-энцефалический барьер и ее влияние на сдвиги свободной и связанной форм ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот в коре, а также в гипоталамусе, где количество свободной ГАМК, по сравнению с другими отделами мозга, более значительно (7, 8).

### Методика

Опыты проводили на собаках-самцах примерно одного возраста весом 18—20 кг. Животных содержали на полноценном пищевом рационе и кормили только после опыта.

У собак предварительно брали общую сонную артерию в кожный валик и перевязывали все ответвления наружной яремной вены, кроме заднелицевой ветви, имеющей непосредственное сообщение с поперечными синусами мозга (9). После выздоровления животных от перенесенной операции и приучения



их к условиям экспериментальной обстановки приступали к проведению исследований. Кровь для исследования в количестве 2 мл брали одновременно из общей сонной артерии, наружной яремной и малой подкожной вен до опыта и через 1, 2, 5 и 10 минут после введения ГАМК. Количество последней определяли электрофоретическим методом Гроссмана и сотр. (10), несколько модифицированным нами.

Белки осаждали 75% спиртом и центрифугировали (5000 об/мин). Надосадочную жидкость выпаривали, остаток растворяли в 6 мл воды и вновь центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость опять выпаривали, остаток растворяли в 0,4 мл воды и 10 мкл жидкости, наносили на электрофоретическую ленту. Электрофорез проводили в течение 10 часов в пиридин-ацетатном буфере (рН 4) при напряжении 5 в/см. Электрофореграммы окрашивали 0,5% раствором нингидрина в ацетоне, высушивали в вытяжном шкафу и для выявления окраски помещали на 20 минут в термостат при 80° С. Пятна ГАМК элюировали в темноте в течение одного часа в 5 мл 75% спирта, насыщенного  $\text{CuSO}_4$ . Количество ГАМК в экстракте определяли фотометрически. Одновременно производили параллельное электрофоретическое определение заранее приготовленного стандартного раствора ГАМК известной концентрации.

Вторая серия опытов была поставлена на крысах-самцах весом 200—220 г. Связанную и свободную ГАМК, а также глутаминсую и аспарагиновую кислоты определяли по методу Ловелла и Эллотта (11). После интраперитонеального введения 10 мг ГАМК на живой вес, животных декапитировали, быстро извлекали мозг и переносили на лед. После удаления сосудистой оболочки выделяли гипоталамус и кору больших полушарий мозга и переносили в заранее взвешенные гомогенизаторы с ледяным Рингер-фосфатным буфером (рН — 7,4) в количестве 3 мл. Гомогенат центрифугировали при 13 000 об/мин при 0° С в течение 20 минут. Надосадочную жидкость, содержащую свободную ГАМК переносили в пробирку с трехкратным объемом 96° спирта. На осадок, содержащий связанную ГАМК, добавляли Рингер-фосфатный буфер в первоначальном объеме, и полученную суспензию нагревали в кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем ее охлаждали и центрифугировали при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость смешивали с тремя объемами 96° спирта. После стояния в течение 0,5—1,0 часа при 0° С обе спиртовые пробы повторно центрифугировали при 10 000 об/мин, надосадочную жидкость переносили в фарфоровую чашку и выпаривали, осадок растворяли в 1 мл воды, центрифугировали и из надосадочной жидкости наносили на электрофоретическую ленту по 0,1 мл из каждой пробы.

Третью серию опытов проводили также на крысах-самцах весом 200—220 г. У животных под нембуталовым наркозом (3 мг/100 г живого веса) обнажали сонную артерию, в которую вводили 1 мг ГАМК. У контрольных животных соблюдали те же условия лишь с той разницей, что вместо ГАМК вводили 0,1 мл физиологического раствора. Животных декапитировали через 1 минуту после введения соответствующих растворов и определяли свободные и связанные формы ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот в коре и в гипоталамусе по вышеизложенной методике.

### Полученные данные и их обсуждение

Результаты исследований, проведенных на собаках, показали (табл. 1), что как в венозной крови, так и в артериальной ГАМК не обнаруживается. Спустя 1 минуту после интракаротидного введения 100 мг ГАМК, в крови, взятой из наружной яремной вены, содержание ГАМК примерно в три раза больше, чем в артериальной крови; этого не наблюдается в крови, взятой из малой подкожной вены. Таким образом, ГАМК, введенная

Таблица 1

Артерио-венозная разница содержания ГАМК в мг% после ее интракаротидного введения (100 мг на живой вес собаки). Приводятся средние данные 12 опытов

Сонная артерия					Яремная вена					Малая подкожная вена				
До введения ГАМК	После введения ГАМК через				До введения ГАМК	После введения ГАМК через				До введения ГАМК	После введения ГАМК через			
	1 мин	2 мин	5 мин	10 мин		1 мин	2 мин	5 мин	10 мин		1 мин	2 мин	5 мин	10 мин
0	0,789	0,5	0,28	следы	0	2,62	2,2	0,6	0,59	0	0,328	0,31	0,262	следы

Таблица 2

Сдвиги содержания свободной и связанной ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот (в мг%) в коре и гипоталамусе мозга белых крыс после интраперитонеального введения 10 мг ГАМК

	Кора				Гипоталамус			
	До введения ГАМК		Через 2 мин. после введения ГАМК		До введения ГАМК		Через 2 мин. после введения ГАМК	
	свободн.	связан.	свободн.	связан.	свободн.	связан.	свободн.	связан.
ГАМК	$16 \pm 1.73$ (9)	$6 \pm 0,89$	$12 \pm 2.07$ $P < 0.001$	$2.3 \pm 1.26$ $P < 0.001$	$31 \pm 1,61$	$15 \pm 2,17$	$38 \pm 2.07$ $P < 0.001$	$13 \pm 2.12$ $P = 0,2$
ГК	$94 \pm 10.6$ (9)	$35 \pm 7,4$	$115 \pm 11,3$ $P < 0.001$	$23 \pm 5,47$ $P = 0,01$	$70 \pm 4,46$	$21 \pm 1,94$	$91 \pm 12,24$ $P > 0,001$ $< 0,005$	$16 \pm 2.19$ $P < 0,025$ $> 0,01,$
АК	$31 \pm 8.71$ (9)	$18 \pm 3,6$	$38 \pm 4,58$ $p < 0,5$	$17 \pm 2,8$ $p < 0,1$ $> 0,2$	$34 \pm 4,5$	$16 \pm 1,64$	$44 \pm 3,09$ $P < 0.001$	$17 \pm 1.92$ $P > 0,4$ $< 0,5$

интракаротидно, в кратчайшее время стимулирует выделение ее мозгом.

На второй минуте количество ГАМК в артериальной крови несколько понижается, а в крови наружной яремной вены содержание ГАМК остается на высоком уровне, примерно в четыре раза больше, чем в артериальной крови. На пятой минуте оно значительно понижается как в артериальной, так и в венозной крови, однако содержание ее в последней вдвое больше. На десятой минуте в пробах крови, взятой из сонной артерии и малой подкожной вены, обнаруживаются только следы ГАМК, в то время как в крови из наружной яремной вены ее уровень составляет 0,59 мг%. Спустя 15—20 минут ГАМК в венозной и артериальной крови не обнаруживалась.

По данным Масловой и Розенгарда (12), после внутривенного или внутрибрюшинного введения ГАМК она не обнаруживается в крови через 60 минут, а в печени, легких и почках через 180 минут отмечаются только ее следы. В этих условиях они не обнаружили каких-либо сдвигов уровня ГАМК в мозгу.

Следует указать, что нельзя судить о проникновении ГАМК через гемато-энцефалический барьер только по изменению ее уровня в целом мозгу, так как неизменное содержание ГАМК в целом мозгу после ее введения не исключает сдвигов в количестве этой кислоты в различных отделах мозга. При внутривенном введении больших доз ГАМК кроликам (13, 14) ее содержание повышалось в лобной области, межуточном, среднем мозгу и спинномозговой жидкости. В исследованиях Бакстера (15) парэнтеральное введение ГАМК вызывало у крыс повышение ее содержания в обонятельных долях.

Полученные нами результаты показывают, что интракаротидное введение ГАМК сопровождается значительно усиленным ее выделением из мозга. По-видимому, сохранение количества ГАМК на постоянном уровне в мозгу после ее введения, которое отмечалось многими исследователями, можно объяснить тем, что она, проникая в мозг, способствует усиленному выделению ее из мозга в кровь в течение первых десяти минут, вследствие чего общее содержание ГАМК не претерпевает изменений. До последнего времени существовало мнение, что глутаминовая кислота также не проникает в мозг. Однако, как показал ряд исследований, между глутаминовой кислотой плазмы и мозга существует тесная взаимосвязь. Проникновение глутаминовой кислоты в мозг сопровождается ее быстрым выделением (16, 17), а общее ее содержание не изменяется.

Ряд исследований, проведенных в нашей лаборатории, показал, что ГАМК через центральную нервную систему стимулирует секрецию адреналина в надпочечниках, который ускоряет распад гликогена в печени (4, 5). Показано также, что интракаротидное введение ГАМК усиливает нейросекрецию в гипо-



таламусе (18). В предыдущих наших опытах показано, что у интактных крыс при наркотическом сне (нембуталовый наркоз) ГАМК не проявляет своего характерного гипергликемического действия (5), наоборот, наблюдается понижение уровня глюкозы в крови и понижение секреции адреналина (19). Нами также было показано (6), что при непосредственном введении ГАМК в область гипоталамуса наблюдается гипергликемический эффект, идентичный тому, который мы получали при ее интраперитонеальном введении. Эти данные свидетельствуют о том, что ГАМК, по-видимому, проникает в мозг и свое действие проявляет через центральную нервную систему.

Полученные результаты побудили нас изучить сдвиги в содержании свободных и связанных форм ГАМК, глутаминовой (ГК) и аспарагиновой (АК) кислот в коре и гипоталамусе крыс.

Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют, что в гипоталамусе содержание как свободной, так и связанной формы ГАМК примерно в два раза выше, чем в коре. Содержание глутаминовой кислоты в гипоталамусе, наоборот, меньше чем в коре, а в содержании аспарагиновой кислоты заметная разница отсутствует.

Через 2 минуты после интраперитонеального введения 10 мг ГАМК на живой вес крысы наблюдалось следующее: в коре содержание свободной ГАМК уменьшалось примерно на 25%, а связанной — на 63%. В гипоталамусе наблюдалась другая картина: содержание свободной формы ГАМК увеличивается примерно на 22%, а связанной — несколько понижается (на 13%). В этих условиях содержание свободной формы глутаминовой кислоты в коре увеличивается примерно на 23%, а связанной — уменьшается на 34%. В гипоталамусе содержание свободной формы увеличивается примерно на 30%, а связанной — уменьшается на 24%.

Содержание аспарагиновой кислоты претерпевает менее значительные сдвиги. В коре содержание ее свободной формы повышается на 22%, а связанной — не меняется. Примерно такая же картина наблюдается в гипоталамусе, где содержание свободной формы аспарагиновой кислоты увеличивается примерно на 29%, а связанной — почти не меняется.

Эти данные свидетельствуют о том, что сдвиги в содержании свободной ГАМК под действием различных судорожных и тормозящих агентов обусловлены не только их действием на ферментативные системы синтеза и распада ГАМК, но и, по всей вероятности, их действием на взаимоотношение связанной и свободной формы ГАМК. Это подтверждается также и другими исследованиями (20).

По-видимому, повышение количества ГАМК в гипоталамусе обусловлено его анатомо-морфологической структурой, где имеются наиболее благоприятные условия для проникновения и

выхода различных химических агентов. Наряду с этим в гипоталамусе представлена ретикулярная формация. Следует отметить, что ряд исследователей придают большое значение роли ретикулярной формации в тормозящем действии ГАМК (21, 22).

Исследованиями Куно (23) и Куртиса (24) установлено, что ГАМК первично блокирует вставочные нейроны. Как известно, нембутал также избирательно блокирует вставочные нейроны. Исходя из этого, следующую серию опытов мы провели на животных, находящихся под нембуталовым наркозом.

Исследованиями Чикваидзе (25) и других авторов показано, что нембутал, в отличие от ряда тормозящих и возбуждающих агентов мозга, не действует на уровень свободной ГАМК. Это подтвердилось и в наших опытах. Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 3, интракаротидное введение 1 мг ГАМК на фоне нембуталового наркоза также не приводит к заметному увеличению свободной ГАМК в гипоталамусе (6%), в то время как содержание связанной ГАМК повышается более чем на 70%. В коре уменьшается содержание свободной (на 32%) и связанной (на 20%) ГАМК. В гипоталамусе свободная форма глутаминовой кислоты, в отличие от предыдущей серии опытов, не претерпевает изменений, в то время как количество связанной формы повышается более чем в три раза. Следует указать, что уровень свободной формы глутаминовой кислоты при нембуталовом наркозе по сравнению с ненаркотизированными животными как в коре, так и в гипоталамусе значительно выше, а связанной — ниже, особенно в гипоталамусе. После введения ГАМК мы не наблюдали существенных сдвигов связанной и свободной формы глутаминовой кислоты в коре больших полушарий.

В гипоталамусе содержание свободной аспарагиновой кислоты увеличивается примерно на 15%, а связанной — на 31%, в то время как в коре не наблюдается заметных сдвигов.

Полученные данные дают основание предполагать, что ГАМК, введенная различными путями, по-видимому, проникает в мозг, при этом уменьшается содержание свободной и связанной ГАМК в коре и увеличивается количество свободной формы в гипоталамусе. Примерно такая же картина наблюдается в отношении содержания ГАМК в коре у наркотизированных животных. У последних в гипоталамусе наблюдается обратная картина: при наличии незначительного увеличения свободной ГАМК в гипоталамусе имеет место резкое увеличение количества ее связанной формы.

Столь разительные сдвиги в содержании глутаминовой и аспарагиновой кислот можно объяснить тем, что ГАМК обладает гипергликемическим действием, повышает утилизацию глюкозы, кроме того она стимулирует цикл трикарбоновых кислот (26), что приводит к образованию дополнительных количеств  $\alpha$ -кето-

Таблица 3

Сдвиги содержания свободной и связанной ГАМК, глутаминовой и аспарагиновой кислот (в мг%) в коре и гипоталамусе мозга у анестезированных крыс после интракаротидного введения 1 мг ГАМК. Средние данные 9-ти опытов

	Кора				Гипоталамус			
	До введения ГАМК		Через 1 мин. после введения ГАМК		До введения ГАМК		Через 1 мин. после введения ГАМК	
	свободн.	связан.	свободн.	связан.	свободн.	связан.	свободн.	связан.
ГАМК	$19 \pm 5,2$	$5 \pm 0,89$	$13 \pm 3,9$ $P < 0,05$ $> 0,025$	$4 \pm 3,3$ $P > 0,5$	$3,3 \pm 4,6$	$7,6 \pm 1,9$	$35 \pm 2,17$ $P = 0,4$	$13 \pm 3,2$ $P < 0,001$
ГК	$127 \pm 9,79$	$28 \pm 13,8$	$135 \pm 16,79$ $P < 0,5$	$35 \pm 9,1$ $P < 0,001$	$107 \pm 8,9$	$8 \pm 7,4$	$103 \pm 21,6$ $P > 0,2$ $< 0,4$	$27 \pm 6,4$ $P < 0,001$
АК	$52 \pm 7,82$	$20,4 \pm 1,28$	$52 \pm 8$	$21 \pm 3,9$	$52 \pm 2,8$	$16 \pm 4,5$	$60 \pm 7,4$ $P < 0,1$ $> 0,05$	$21 \pm 5,1$ $P < 0,5$ $> 0,4$



глутаровой и щавелевоуксусной кислот, а ГАМК, путем трансаминирования с ними, вызывает увеличение содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот. При нембуталовом наркозе, как мы уже упоминали, ГАМК не проявляет гипергликемического действия, вследствие чего в мозгу не наблюдается заметных сдвигов содержания глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Следует также учитывать, что ГАМК оказывает существенное влияние на содержание связанной и свободной форм глутаминовой кислоты, как и самой ГАМК, а возможно — и других веществ. В нашей лаборатории Есаян показала, что ГАМК способствует высвобождению норадреналина в мозгу.

По всей вероятности, тормозящее действие ГАМК в ЦНС млекопитающих обусловлено не только самой ГАМК, но также и сдвигами в содержании целого ряда других веществ.

Полученные нами результаты представляют интерес для выяснения механизма центрального действия ГАМК, ее проникновения в мозг. Для окончательного разрешения вопроса необходимы дополнительные исследования с меченой ГАМК.

### Выводы

1. Внутрикратидное введение ГАМК взрослым собакам сопровождается усиленным ее выделением из мозга в течение первых десяти минут после введения. Этого не наблюдается в мышечной ткани.

2. Неизменное содержание ГАМК в мозгу, которое наблюдалось при ее введении у различных авторов, следует объяснить усиленным выделением ГАМК из мозга.

3. Интраперитонеальное введение ГАМК у взрослых белых крыс приводит к значительному снижению связанной в коре и к повышению свободной ГАМК в гипоталамусе. Содержание свободной глутаминовой кислоты как в коре, так и в гипоталамусе увеличивается, а связанной — уменьшается. Количество свободной аспарагиновой кислоты в коре и гипоталамусе увеличивается, а связанной — не претерпевает изменений.

4. Нембуталовый наркоз не оказывает существенного влияния на содержание связанной и свободной ГАМК в коре, в то время как в гипоталамусе содержание свободной ГАМК не изменяется, а связанной — уменьшается в значительной степени. На этом фоне интракратидное введение ГАМК (через 1 минуту после введения) приводит к уменьшению содержания свободной ее формы в коре, а связанная — не претерпевает изменений. В гипоталамусе, наоборот, количество свободной — не меняется, а связанной — значительно увеличивается.

5. При нембуталовом наркозе значительно увеличивается содержание свободной глутаминовой и аспарагиновой кислот как в коре, так и в гипоталамусе. В коре головного мозга содержание

связанной глутаминовой и аспарагиновой кислот остается без изменений. В гипоталамусе уменьшается только количество связанной формы глутаминовой кислоты.

У наркотизированных крыс после интракаротидного введения ГАМК содержание глутаминовой кислоты в гипоталамусе увеличивается примерно в три раза, свободной — не изменяется, а количество связанной и свободной аспарагиновой кислоты не подвергается особым изменениям.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wood J. D., Watson W. J., Clidesdale F. M., *J. Neurochem.*, **10**, 625, 1963.
2. Van Gelder N. M., Elliott K. A. C., *J. Neurochem.*, **3**, 139, 1958.
3. Purpura D. P., Carmichael M. W., *Science*, **131**, 10, 1960.
4. Buniatian H. Ch., *Studies of the role of gamma-aminobutyric acid in carbohydrate metabolism*. Erevan, 1961.
5. Казарян Б. А., *Известия АН Арм. ССР (биол. науки)*, **15**, 11, 1962.
6. Бунятян Г. Х., Казарян Б. А., *Вопросы биохимии мозга*, вып. 1, 79, 1964.
7. Berl S., Waelsch H., *J. Neurochem.*, **3**, 161, 1958.
8. Sunita J. S., Malhotra C. L., *J. Neurochem.*, **9**, 37, 1962.
9. Кедров А. А., Науменко А. И., Дегтярева З. Я., *Бюлл. экп. биол. и мед.*, **9**, 10, 1954.
10. Grassmann W., Hanning E., Plocke M., Hoppe-Seylers Z. *phys. chem.*, **299**, 258, 1955.
11. Lovell R. A., Elliott K. A. C., *J. Neurochem.*, **10**, 479, 1963.
12. Маслова М. Н., Розенгард В. Н., *Роль гамма-аминомасляной кислоты в деятельности нервной системы (материалы к симпозиуму «Физиол. биохим. и фармак. эффекты гамма-аминомасляной кислоты в нервной системе)*. Л., 36, 1964.
13. Wiechert P., Schroter P., *Acta biol. et med. German.*, **12**, 475, 1961.
14. Wiechert P., *Acta biol. et med. German.*, **10**, 305, 1963.
15. Baxter C. F., *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **1**, 38, 20, 1962.
16. Berl S., Lajtha A., Waelsch H., *Chemical pathology of the nervous system*, Pergamon press, Ed. Folch-Pi J., 361, 1961.
17. Berl S., Takagaki H., Purpura D. P., *J. Neurochem.*, **7**, 198, 1961.
18. Galoyan A. A., *Pathologie et Biologie X congress Intern. de Biologie cellulaire*, Paris **9**, 682, 1961.
19. Есаян Н. А., Налбандян Р. М., *Вопросы биохимии*. Изд. АН Арм. ССР, **3** 85, 1963.
20. Elliott K. A. C., Van Gelder N. M., *J. physiol.*, **153**, 423, 1960.
21. Benetato G., Haulica J., Bubuiani E., Bittmann E., Benetato V., Ghizari E., Nastiani V., Gabrilescu E., Dumitriu S., *Studii Si Cercetari Fiziol. Acad. RPR*, **7**, 159, 1962.
22. Benetato G., Haulica J., Bubuianu E., Bittmann E., Benetato V., Ghizari E., Nastiani V., Gabrielescu E., Dumitriu S., *Studii Si Cercetari Fiziol. Acad. RPR*, **6**, 561, 1961.
23. Kuno Motoi, *Japan J. physiol.*, **11**, 304, 1961.
24. Curtis D. R., Phillis J. W., Watkins J. C., *J. physiol.* **146**, 185, 1959.
25. Чиквандзе В. Н., *Труды 3-ей Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы*. Изд. АН Арм. ССР, **181**, 1963.
26. Бунятян Г. Х., *Новые данные о роли гамма-аминомасляной кислоты в мозговой ткани. Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы.*, **133**, 1963.

## МОЧЕВИНА В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ БИОХИМИИ МОЗГА

З. С. Гершенович, А. А. Кричевская, И. М. Агафонова,  
И. В. Готлобер, А. И. Лукаш, В. С. Шугалей, Л. А. Щербина

Кафедра биохимии Ростовского-на-Дону государственного университета,  
Ростов-на-Дону

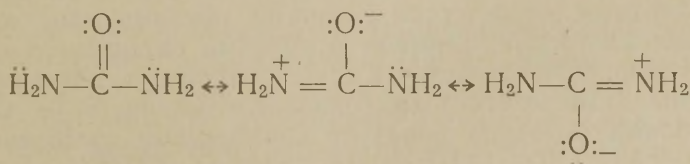
В молекуле мочевины сосредоточены свойства, определяющие возможности ее взаимодействия со многими биоорганическими соединениями клетки. Это дает право рассматривать мочевины не только как конечный продукт азотистого метаболизма, но и как соединение, участвующее в различных реакциях обмена.

Мочевина — диамид угольной кислоты со многими свойствами амидов карбоновых кислот.

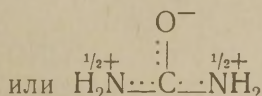
Методом рентгеноструктурного анализа установлено, что длина связи СО в мочеине равна 1,262 Å, а CN — 1,335 Å. Следовательно, расстояние СО в мочеине длинее, чем в кетонах, и CN — короче, чем в аминах. На основании этого сделано заключение, что в мочеине происходит сопряжение между  $\pi$ -электронами двойной связи  $C=O$  и неподеленными электронами атомов азота такого же типа, но более сильнее, чем у амидов карбоновых кислот.

Мочевина представляет собой цвиттерион и обладает большим дипольным моментом, равным 4,56.

Распределение электронов изображается следующими предельными структурами (1):



или



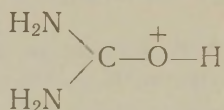


Колацико (2) считает, что мочеви́на представляет собой цвитте-рион с преобладанием положительного заряда.

Мочевина — одно из немногих соединений, которое повышает диэлектрическую постоянную воды.

Мочевина имеет высокую точку плавления, равную  $132,7^{\circ}\text{C}$  и константу диссоциации  $K_b = 1,5 \cdot 10^{-14}$ , тогда как производные мочевины, не способные к таутомерии, например, о-метилизо-мочевина, имеют точку плавления  $45^{\circ}$  и  $K_b = 6,4 \cdot 10^{-5}$ .

Возможна протонизация молекулы мочевины. При этом протон связывается с кислородом, как это доказано в случае амидов.



Поэтому мочеви́на является слабым основанием, т. к. превращение в катион уменьшает возможность сопряжения. Аналогично протону, с атомом кислорода могут связываться и алкильные группы, при этом образуются О-алкилпроизводные.

Измерением валентных углов, которые мало отличаются от  $120^{\circ}$ , и методом ядерного магнитного резонанса и дифракции электронов установлено, что молекула мочевины имеет плоское и симметричное строение и атомы водорода копланарны с другими атомами молекулы.

Хорошо известна способность мочевины образовывать водородные связи. Гауровитц (3) полагает, что полярные молекулы мочевины вклиниваются между водородными мостиками, например, в пептидных цепях. При этом разрываются водородные связи и образуются новые с освободившимися группами.

Растворы мочевины и некоторых амидов имеют низкую вязкость (4). Авторы полагают, что мочеви́на ориентирует близко расположенные молекулы воды и при этом разрываются межмолекулярные водородные связи воды, разрушаются «водные скопления».

Многообразные физико-химические свойства мочевины определяют возможность ее взаимодействия с парафинами, олефинами, спиртами, альдегидами, кетонами, эфирами, моно- и дикарбоновыми кислотами, аминами и другими соединениями (5, 6, 7). Мочевина взаимодействует как с полярными, так и неполярными участками молекул аминокислот и белков (8, 9). Со многими солями мочеви́на образует комплексные соединения, например,  $\text{NH}_4 \cdot \text{NO}_3 \cdot \text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ;  $2\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ;  $\text{NaCl} \cdot \text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  и др. Очень важна способность мочевины замещать гидратную воду в некоторых соединениях, например,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  превращается в  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ .

Не менее интересна и биологически важна способность моче-

вины образовывать соединения включения, типа решетчатых канальных соединений (10).

Мочевина, широко распространенная в тканях, может выполнять функции поддержания структуры и свойств белков и нуклеиновых кислот, повышать растворимость низкомолекулярных соединений.

Показателен материал И. М. Спектора (11), который предположил, что белки обладают способностью к саморегулированию структуры и свойств. Мочевина способствует возвращению измененного белка к среднему исходному состоянию, независимо от направления изменения.

Синтез мочевины в мозгу не вызывает сомнений. Важно изучить биологическое значение постоянного синтеза в различных органах, его пути и локализацию.

Некоторые авторы (12) считают, что внепеченочный синтез мочевины имеет значение только как способ образования биологически активных промежуточных продуктов — карбамилфосфата, аргинина и др. Однако Кемп, Диксон и Вутбери (13) не подтвердили этих представлений. Они показали, что процесс направлен в сторону образования конечного продукта — мочевины.

Мы исследовали синтез мочевины в субклеточных фракциях мозга и для сравнения — в печени.

Навеску мозга или печени (2—3 грамма) 2 минуты гомогенизировали с 9-кратным объемом 0,4 М сахарозы на трис-НСI буфере pH 7,5. Центрифугировали при 0°С 10 минут при 2000 g для отделения обломков клеток и ядер. Надосадочную жидкость снова центрифугировали 10 минут при 0°С при 16 000 g. В осадок выпадали митохондрии. Осадок промывали дважды смесью сахарозы с трис-буфером pH 7,55. Чистоту фракции определяли микроскопически, окрашивали гематоксилином по Гейденгайну. Коэффициент фосфорилирования равен 1,6—2,2.

Надосадочную жидкость, оставшуюся после отделения митохондрий и содержащую микросомы и другие субклеточные частицы, называли условно «микросомальной фракцией». Синтез мочевины исследовали отдельно в митохондриях и «микросомальной фракции».

Каждая проба содержала митохондрии или микросомальную фракцию в расчете на белок в 3 мл 0,4 М сахарозы на трис-НСI буфере pH 7,55. К каждой пробе добавляли до 0,018 М АТФ, 0,005 М  $Mg^{++}$  и 0,055 М глюкозы (конечные концентрации). В ряд проб, кроме того, добавляли 40 мкМ орнитина, или по 40 мкМ цитруллина и аспартата, или по 40 мкМ всех трех аминокислот. Кроме того, в субфракциях мозга определяли синтез мочевины при добавлении 40 мкМ гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК).

Контролем служили пробы, инактивированные 2-минутным

кипячением. Активность аргиназы определяли в пробах такого же состава (во фракциях с энергетическими добавками), но с добавлением 40 мкМ аргинина.

Пробы инкубировали при 37° 45 минут. Затем белки осаждали 10% ТХУ. В надосадочной жидкости определяли мочевины уреазным методом. Белок определяли по Лоури с сотр.

Мы не обнаружили синтеза мочевины в митохондриях мозга и печени даже при добавлении всех субстратов цикла Кребса-Генселейта (табл. 1).

Таблица 1

Синтез мочевины в субклеточных фракциях мозга и печени крыс в мкмольях мочевины на 1 г сырой ткани

Мозг

Контроль		Энергетические добавки (а)		а + орнитин		а + цитруллин + аспарат		а + орнитин + цитруллин + аспарат		а + аргинин	
I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	2,9	0	3,3	0	4,6	0	6,2	0	8,1		6,6
Прирост к контролю			+0,4		+1,7		+3,3		+5,2		+3,7

Печень

0	3,7	0	4,0	0	5,8	0	11,6	0	13,3		33,9
Прирост к контролю			+0,3		+2,1		+7,9		+9,6		+24,7

I — митохондрии; II — микросомальная фракция.

Мора, Мартуселли и др. (14) установили, что в печени крыс карбамилфосфатсинтетаза и орнитинтранскарбамилаза локализованы главным образом в митохондриях и ядрах, в то время как большая часть аргиназной активности связана с фракцией микросом. У других видов, например аксолотлей, ферментные активности распределены иначе.

Можно предположить, что митохондрии мозга, как и митохондрии печени крыс, не содержат полного набора ферментов синтеза мочевины.

Несмотря на отсутствие в митохондриях печени обнаруживаемого синтеза мочевины, в них имеется активная аргиназа: за 45 мин при 38°С образуется 13,3 мкМ мочевины на грамм ткани.

В «микросомальной фракции» мозга происходит интенсивный синтез мочевины из компонентов цикла Кребса-Генселейта (табл. 1).



В полной системе прирост мочевины по сравнению с инактивированными пробами составляет в мозгу 180%, в печени — 260% (рис. 1). В митохондриях и микросомальной фракции обнаружена орнитинтранскарбамилазная активность, которую мы определяли методом Деманж с сотр. (16).

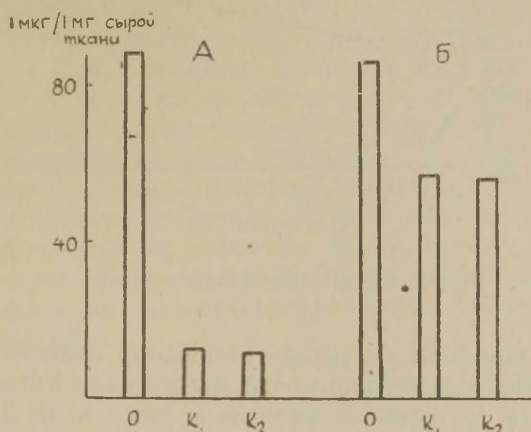


Рис. 1. Орнитинтранскарбамилазная активность мозга (в мкг на 1 мг сырой ткани).

А. Митохондриальная фракция. О — опыт (500 мкМ мышьяка + 200 мкМ цитруллина; К<sub>1</sub> — контроль 1 (500 мкМ мышьяка); К<sub>2</sub> — контроль 2 (200 мкМ цитруллина). Б. «Микросомальная» фракция. Обозначения те же, что и на рис. А.

В «микросомальной фракции» мозга синтез мочевины наблюдается и при добавлении вместе с энергетическими субстратами гамма-аминомасляной кислоты вместо орнитина. Интенсивность его только на 11,9% ниже, чем в пробе с орнитином.

Мочевина изменяет свойства белков. Это установлено нами в опытах с действием разных концентраций мочевины на растворимость белков мозга. Из мозга крыс при  $-15^{\circ}\text{C}$  готовили ацетоновые порошки. Из них белки экстрагировали водой и растворами мочевины в концентрациях 0,2, 0,5, 1,0 и 3,0 М. Экстракцию проводили при температуре  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 18 часов. В экстрактах определяли содержание белка по Лоури с сотр. (15).

В 0,2 М раствор мочевины белка переходит на 10% меньше, чем в воду, однако разница статистически не достоверна. В растворах с большей концентрацией мочевины — 0,5; 1,0 и 3,0 М растворимость белка выше. При концентрации мочевины в 3 М белка в раствор переходит на 30% больше, чем в воду (рис. 2).

Можно заключить, что это происходит из-за изменения свойств белков мозга при взаимодействии с мочевиной.

мкг/мл

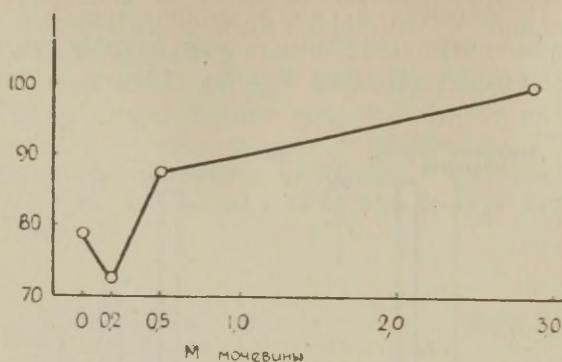


Рис. 2. Содержание белка в экстракте.

Для исследования характера изменения свойств белка и причин увеличения их растворимости мы изучали УФ-спектры растворов белка в мочеvine в диапазоне длин волн 245—285 мкм. Оптическая плотность растворов белка в растворах 0,2; 0,5 и 1,0 М мочевины не изменялась или значительно понижалась, несмотря на увеличение в них концентрации белка.

Только в растворе 3,0 М мочевины происходит значительное увеличение оптической плотности раствора (рис. 3).



Рис. 3. УФ спектры поглощения суммарных экстрактов из ацетоновых порошков мозга.

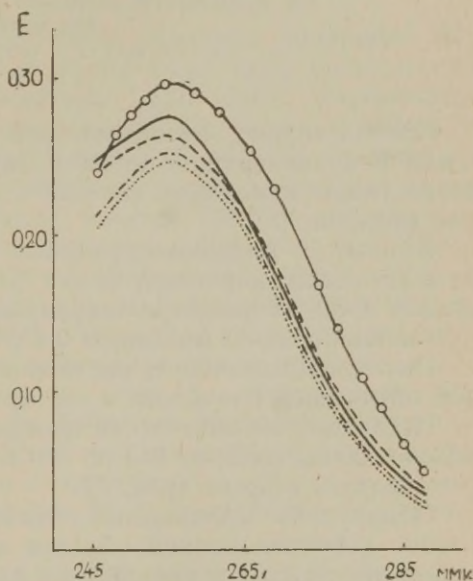
— контроль; — — — — 0,2 М мочевины; — · — · — 0,5 М мочевины; · · · · · 1,0 М мочевины; о — о — о 3,0 М мочевины.

Очевидно, параллельно увеличению концентрации белка в растворе, которое должно было бы привести к увеличению оптической плотности, идет процесс, компенсирующий ее возрастание.

Оптическая плотность возрастает только при экстракции ацетоновых порошков 3,0 М раствором мочевины.

Оптическая плотность экстракта из ацетоновых порошков мозга складывается из суммы оптической плотности высокомолекулярной (белки и нуклеиновые кислоты) и низкомолекулярной (нуклеотиды и ароматические аминокислоты) фракций. Мы разделили суммарный водный экстракт из ацетоновых порошков на низко- и высокомолекулярную фракции. Для этого к экстрактам при  $0^{\circ}\text{C}$  (водному и мочевинным) добавляли равные объемы 0,4 М  $\text{HSClO}_4$ . Осадок отделяли центрифугированием, и в соответствующих экстрактах доводили концентрацию мочевины до 0,2; 0,5; 1,0 и 3,0 М. Измеряли оптическую плотность низкомолекулярной фракции, которая содержала главным образом свободные нуклеотиды.

Рис. 4. УФ спектры поглощения низкомолекулярных компонентов экстрактов из ацетоновых порошков мозга. Обозначения см. к рис. 3.



Из рис. 4 видно, что увеличение оптической плотности экстракта раствором 3,0 М мочевины определяется увеличением в ней концентрации нуклеотидов, максимум поглощения которых лежит при 255 ммк. Оптическая плотность нуклеотидной фракции, полученной из водных экстрактов ацетоновых порошков, как описано выше, не изменяется при последующем добавлении к ним мочевины до конечных концентраций 0,2 и 3,0 М (рис. 5).



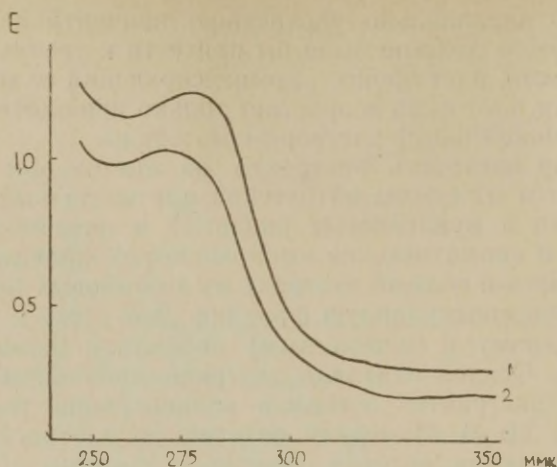


Рис. 5. УФ спектры поглощения высокомолекулярных компонентов экстракта из ацетоновых порошков мозга.

1 — в  $H_2O$ ; 2 — в 0,2 М мочеvine.

Следовательно, несоответствие величины оптической плотности и концентрации белка в экстрактах может быть только результатом изменения свойств и структуры высокомолекулярной фракции.

Высоко- и низкомолекулярные фракции водных экстрактов из ацетоновых порошков мозга разделяли на колонке с сефадексом Г-50. В высокомолекулярной фракции создавали конечную концентрацию мочевины 0,2 М.

Оптическая плотность растворов белка складывается из собственной оптической плотности и светорассеяния.

Исследование оптической плотности раствора в широком диапазоне длины волн, от 245 до 370 ммк, дает возможность дифференцировать эффект (рис. 6).

Обнаружено уменьшение оптической плотности во всем диапазоне коротковолновой области от 245 до 285 ммк. Одновременно происходит и уменьшение рассеяния, которое определяется в зоне длин волн от 300 до 370 ммк, где собственное поглощение белка отсутствует. Уменьшение светорассеяния при действии мочевины на раствор белка происходит из-за дезагрегации белковых молекул, наступающей вследствие разрыва каких-то связей внутри молекулы белка, либо между белками и другими компонентами фракции. В предыдущем исследовании (17) нами показано, что растворимые белки мозга связаны с РНК и нуклеотидами.

Для выяснения свойств связи между белками и нуклеотидами

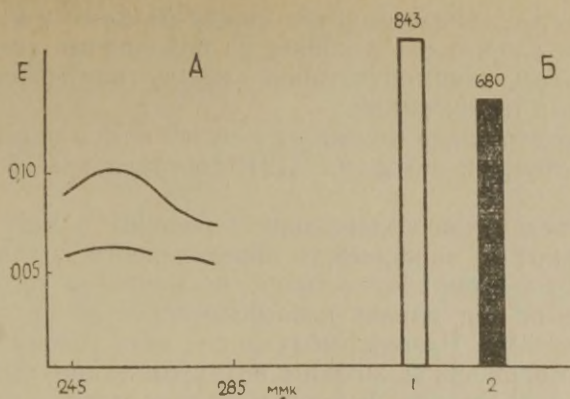


Рис. 6. Влияние 3 М мочевины на связи между белками, РНК и нуклеотидами мозга.

А. УФ спектры связанных нуклеотидов. Б. Содержание РНК (в мкг/100 мг белка). 1 — контроль, 2 — после обработки 3 М мочевиной.

мы исследовали влияние на нее 3,0 М раствора мочевины. Из водного экстракта ацетонового порошка мозга крыс высаливали белковую фракцию, осаждавшуюся при 50% насыщении  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Фракцию делили на 2 части. Первую, служившую контролем, пятикратно переосаждали в водных растворах  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50% насыщения. Вторая часть была дважды переосаждена в аналогичных условиях, а затем трижды обработана полунасыщенным серноокислым аммонием, приготовленным на 3,0 М мочевины. Время обработки и объемы промывных растворов в контроле и опыте были одинаковы. В обработанных таким образом частях белковой фракции определяли связанные нуклеотиды, РНК по УФ-спектрам поглощения и белок по Лоури.

Результаты, представленные на рис. 6, свидетельствуют, что действие 3,0 М мочевины на фракцию приводит к резкому снижению количества связанных с ней нуклеотидов, вплоть до исчезновения их спектрального максимума.

Количество комплексированной РНК в расчете на белок фракции снижается на 19,3%.

Результаты позволяют считать, что связи между белками и нуклеотидами расщепляются под действием 3,0 М мочевины. Они также подтверждают предположение о том, что связанные нуклеотиды являются фрагментами РНК, непосредственно участвующими в образовании связей между белками и РНК, так как аналогичная динамика при действии мочевины обнаруживается и для комплексированной РНК. Меньший эффект в случае РНК, видимо, есть следствие разных типов связей, существующих между белками и РНК.

Действие мочевины на связи между белками и нуклеотидами может быть следствием влияния на водородные связи и конкурентным типом взаимоотношений между комплексированными нуклеотидами и мочевиной.

Общее содержание мочевины в мозгу крыс, определенное нами (18) и другими авторами (19), составляет 4—5 мкМ/грамм ткани.

При определении содержания мочевины в мозгу мы обратили внимание на зависимость определенного количества мочевины от условий обработки ткани, несмотря на то, что ни один из способов не мог влиять непосредственно на сохранность молекулы мочевины. Разница получается, если готовить ТХУ-экстракт из замороженной жидким воздухом ткани мозга или при комнатной температуре. В первом случае содержание мочевины в мозгу было 3,28, а во втором — 4,1 мкМ мочевины на грамм сырой ткани.

В другой серии опытов мозг крысы гомогенизировали в фосфатном буфере рН 7,5 и сейчас же осаждали 12% ТХУ. В части проб содержания мочевины определяли немедленно (пробу центрифугировали, нейтрализовали и определяли мочевины уреазным методом), в других — через 60 минут после инкубации при 37°С. В первом случае мы определили в среднем 4,9 мкМ, а во втором — 10,1 мкМ мочевины на грамм ткани.

Такую постановку опыта мы повторяли с той лишь разницей, что белки осаждали кипячением при нейтральном рН. В пробе, где мочевины определяли немедленно после отделения осадка, содержалось 4,1 мкМ, а после 60-минутной инкубации — 6,6 мкМ мочевины на грамм ткани.

Мы ранее высказывали предположение и приводили доказательства наличия в ткани мозга кроме свободной, также связанной мочевины. Способ связи мочевины с белком, исходя из свойств мочевины, может быть разным. Один тип связи разрывается действием трипсина на гомогенаты мозга крыс. При этом количество освобожденной мочевины составляет 26,3% по отношению к контролю (20).

В представленных выше сериях опытов также происходит освобождение связанной мочевины. Ферментативный синтез мочевины в условиях опыта исключен (рис. 7).

Содержание мочевины в мозгу крыс изменяется при различных воздействиях. При содержании крыс в холодной камере с постоянной температурой 0—1°С в течение 105 дней, динамика мочевины в мозгу приведена на рис. 8.

Акклиматизация к низкой температуре наступает к 45-му дню. Это совпадает с нормализацией содержания мочевины в мозгу, которое на 30—37 день проходит через максимум.

При принудительном охлаждении крыс по ректальной температуре до 20° содержание мочевины в мозгу понижается и про-



Рис. 7. Влияние условий обработки на освобождение мочевины (в мМ/г ткани).

А. Осаждение белков 10% раствором ТХУ.  
Б. Осаждение белков кипячением.

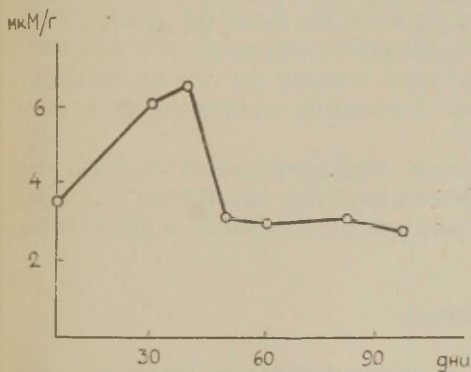
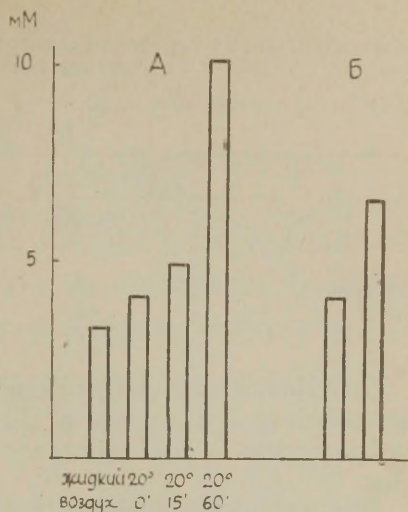


Рис. 8. Мочевина в мозгу при акклиматизации к холоду.

должает снижаться при самосогревании до температуры 37—38°С. При многократном охлаждении концентрация мочевины в мозгу продолжает оставаться ниже контроля. Особенно низкое содержание мочевины в мозгу определено после 13-кратного охлаждения: оно составляет 1,8 мкМ на грамм сырой ткани. Последующее переохлаждение таких животных приводит к дальнейшему уменьшению содержания мочевины в мозгу.

В то же время предварительное введение мочевины крысам оказывает защитное действие. У охлажденных крыс не развивается глубокий холодовой наркоз. Животные даже при снижении температуры тела до 9—10° остаются активными. У животных, защищенных мочевиной, период самосогревания сокращается с 291 минуты у контрольных до 159 у подопытных (среднее из 100 опытов). Значительно снижается летальность животных в следующий за переохлаждением период (табл. 2).

**Летальность после переохлаждения и последующего самосогревания в %  
от количества взятых животных**

(Подопытным животным за 30 минут до охлаждения вводили 100 мг мочевины на 100 г веса)

	Ректальная температура тела		
	19—20°	14—15°	9—10°
Контроль	32	73	100
Опыт	18	60	80

Особенно важна наблюдающаяся относительная стабильность как энергетического, так и азотистого метаболизма мозга у переохлажденных, но предварительно защищенных мочевиной крыс.

Все материалы свидетельствуют об активной роли мочевины в регуляции метаболизма мозга. Её регуляторная роль осуществляется путем образования аддуктов, в которых сама мочевина является лигандой. Взаимодействуя с белками, и в том числе с белками-ферментами, мочевина влияет на их активность. Уже опубликовано немало работ о влиянии мочевины на активность многих ферментов (21, 22).

Метаболическая роль мочевины подтверждается и тем, что в мозгу и других тканях неуреотелических животных (птицы, рептилии, некоторые рыбы) обнаружена мочевина и ферменты ее синтеза.

### Выводы

1. Мочевина синтезируется в микросомальной фракции мозга.
2. Мочевина влияет на связь между белками и нуклеотидами.
3. Мочевина содержится в мозгу в свободной и связанной форме.
4. Концентрация мочевины в мозгу изменяется под влиянием внешних факторов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Неницеску К. Д., Органическая химия, 1962.
2. Colacicco G., Nature, **198**, 584, 1963.
3. Гауровиц Ф., Химия и функция белков, 1965.
4. Ruplev J. A., J. physical chem., **68**, 2002, 1964.
5. Bengen F., Schlenk W., Experientia, **5**, 200, 1949.
6. Schlenk W., Holman R. T., Science, **112**, 19, 1950.

7. Руденко Н. З., ЖОХ, 35, 1323, 1965.
8. Vasuhiko Nozaki, Ch. Tanford, J. Biol. Chem. 238, 12, 1963.
9. Wetlaufer D. B., Malik S. K., Stoller L., Coffin R. L., J. Amer. Chem. Soc. 86, 508, 1964.
10. Краммер Ф., «Соединения включения», 1958.
11. Спектор И. М., Биофизика, 11, 406, 1966.
12. Le Lorenzo Francesco, Illiano Gennaro, Atti Accad. naz. Lincei. Rend. Cl. sci. fis., matenatur., 38, 1, 96, 1965.
13. Kemp., Dixon., Wetbery, Biochim., Biophysica acta, 111, 23, 1965.
14. Mora R., Martuscelli J., Ortiz-Pineda J., Soberov G., Biochem. J., 96, 28, 1965.
15. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., a. Randall K., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
16. Demange G., Ballan P., Moretti, Stasfen F., Presse med. 70, 1032, 1962.
17. Гершенович З. С., Лукаш А. И., Материалы 2-й Всесоюзной конф. по нуклеиновым кислотам (в печати).
18. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Шугалей В. С., ДАН СССР, 157, 464, 1964.
19. Tallan H. H., Moore S., Stein., J. Biol. Chem., 211, 917, 1954.
20. Агафонова И. М., Кричевская А. А., Гершенович З. С., ДАН СССР, 168, 456, 1966.
21. Richterich R., Burger A., Helv. physiol. Pharm. acta, 21, 59, 1963.
22. Tahin A. S., Paiva A. C., Anal. Acad. Brasil. ciênc., 34, 351, 1962.



## ИНСУЛИНОВАЯ ГИПОГЛИКЕМИЯ И СОДЕРЖАНИЕ АММИАКА В МОЗГУ

М. Ф. Мережинский и С. М. Никитина

Кафедра биохимии Минского государственного института, Минск

В последнее десятилетие характеристика инсулина была дополнена таким его свойством, как обеспечение анаболического направления в белковом обмене. Введение белым крысам физиологических доз инсулина ведет к уменьшению концентрации в тканях печени, мозга, мышц и селезенки свободных аминокислот: треонина, серина, аланина, глицина, валина, цистина, лейцина, тирозина, фенилаланина, лизина, триптофана, гистидина, арганина и аспарагиновой кислоты. Одновременно в этих тканях наблюдается повышение концентрации общего содержания пептидов и белков (1). Благодаря этому инсулин приводит к уменьшению в упомянутых тканях концентрации свободных аминокислот.

В печени такой процесс сочетается с увеличением биосинтеза гликогена и снижением концентрации в ткани и крови свободной глюкозы. Усилению процессов биосинтеза белка и гликогена в организме предшествует усиление в тканях образования восстановленного глутатиона.

Введение больших доз инсулина, приводящих к резко выраженной гипогликемии, инсулиновой коме и судорожному состоянию, характеризуется не анаболическими, а катаболическими процессами. Это приводит к уменьшению концентрации в головном мозгу гликогена, полипептидов и белков. Одновременно уменьшается содержание восстановленного глутатиона. В печени и мышцах происходят аналогичные процессы. В прошлом в связи с этим мы подчеркивали, что судорожное состояние при инсулиновой гипогликемии следует объяснять не только уменьшением концентрации глюкозы в крови, но и образованием токсических продуктов. Известно, что продукты распада глюкозы и аминокислот, молочная кислота и аммиак могут быть причиной состояния возбуждения, вплоть до возникновения судорог (2).

Как известно, содержание аммиака в головном мозгу является весьма лабильным и концентрация его колеблется в значи-

тельной мере в зависимости от способа фиксации. Как упоминает А. В. Арутюнян (3), декапитация без применения замораживания приводит почти к десятикратному повышению количества аммиака в мозгу. Мы поэтому решили применить замораживание всего животного с помощью жидкого кислорода. Лишь после этого вскрывали черепную коробку, извлекали мозг и затем растирали его в жидком кислороде. Затем навески порошка гомогенизировали. После центрифугирования (3000 об/мин) содержание аммиака определяли диффузионным методом Зелигсона (4) в модификации А. И. Силаковой (5).

Содержание аминокислот определяли методами К. Гири, А. Радгакришнан, К. Вайдианатан (6) и Ф. Боде (7) в модификации Г. Н. Зайцевой и Н. П. Тюленевой (8). При определении аминокислот получаемые из мозговой ткани экстракты доводили перед окончательным центрифугированием подкислением водных экстрактов до pH 2. В опыт отбирались крысы-самцы весом около 250 г. Перед экспериментом животные были лишены пищи в течение 24 часов. Принятая нами шоковая доза инсулина равнялась 360 единицам на кг веса тела животных, или 90 единицам на животное весом в 250 г. Животные умерщвлялись в различные периоды развития гипогликемии и инсулинового шока. Одновременно умерщвляли контрольное животное весом в 250 г,

Таблица 1

Концентрация в больших полушариях головного мозга белых крыс азота аммиака, амидоазота глутамина и гамма-аминомасляной кислоты, выраженная в мг% влажного веса

Исследуемое вещество	Контроль	Стадии инсулиновой гипогликемии			Отклонения от контроля в процентах
		Начальная	Глубокая	Шок	
Азот аммиака	$0,78 \pm 0,23$	—	—	—	0
" "	—	$0,72 \pm 0,21$	—	—	-7,7
" "	—	—	$1,04 \pm 0,28$	—	+33,0
" "	—	—	—	$1,53 \pm 0,31$	+96,1
Амидоазот глутамина	$7,23 \pm 0,44$	—	—	—	0
" "	—	$6,82 \pm 0,41$	—	—	-5,7
" "	—	—	$4,32 \pm 0,35$	—	-40,0
" "	—	—	—	$3,12 \pm 0,38$	-56,9
Гамма-аминомасляная кислота	$18,8 \pm 1,4$	—	—	—	0
" "	—	$19,1 \pm 1,2$	—	—	+1,6
" "	—	—	$18,7 \pm 1,8$	—	0
" "	—	—	—	$18,1 \pm 1,8$	-4,0

сутки голодавшее, которому вводили физиологический раствор вместо инсулина.

Результаты исследований представлены в следующих двух таблицах. В первой таблице даны средние величины концентрации в мозгу азота аммиака, амидоазота глутамина и гамма-аминомасляной кислоты 25 контрольных и 75 экспериментальных крыс.

Во второй таблице отражены данные определений у 15 контрольных и 30 экспериментальных белых крыс концентрации в больших полушариях мозга 10 аминокислот.

Таблица 2

Концентрация аминокислот в больших полушариях мозга белых крыс в контроле и после введения инсулина, выраженная в мкМ/г ткани влажного веса

Исследуемая аминокислота	Контроль	Инсулиновая гипогликемия		Отклонения от контроля в процентах
		Отсутствие шока	Инсулиновый шок	
Аланин	$0,732 \pm 0,181$	$0,631 \pm 0,145$	—	—23,8
Аргинин	$0,148 \pm 0,031$	$0,123 \pm 0,021$	$0,219 \pm 0,053$	—70,0
Гистидин	$0,119 \pm 0,022$	$0,123 \pm 0,019$	$0,085 \pm 0,012$	—16,9
Глицин	$0,801 \pm 0,135$	—	$0,110 \pm 0,021$	—42,5
Глутаминовая кислота	$8,931 \pm 2,421$	$6,324 \pm 1,901$	—	+3,3
Метионин	$0,043 \pm 0,012$	$0,035 \pm 0,007$	$5,242 \pm 1,936$	—7,6
Серин	$1,215 \pm 0,140$	$1,012 \pm 0,084$	—	—2,3
Тирозин	$0,079 \pm 0,012$	$0,071 \pm 0,014$	$0,807 \pm 0,096$	—4,7
Треонин	$0,501 \pm 0,114$	$0,321 \pm 0,110$	—	—25,3
Цистин	$0,023 \pm 0,014$	$0,015 \pm 0,004$	$0,210 \pm 0,103$	—41,3
"	"	—	$0,008 \pm 0,001$	—18,9
"	"	"	"	—32,6
"	"	"	"	—16,7
"	"	"	"	—33,6
"	"	"	"	—10,2
"	"	"	"	—21,9
"	"	"	"	—39,7
"	"	"	"	—58,1
"	"	"	"	—34,8
"	"	"	"	—64,9

### Обсуждение результатов

Под воздействием больших доз инсулина, когда у животных возникают судороги, происходит повышение концентрации аммиака в ткани больших полушарий головного мозга. При этом стадии гипогликемии, прилегающие к состоянию шока, также



характеризуются заметным увеличением содержания азота аммиака в мозговой ткани. Начальные стадии гипогликемии, развивающиеся вскоре после введения в организм животного инсулина, не характеризуются еще повышением концентрации аммиака в мозгу. Прямо противоположный характер изменений наблюдался в эти периоды в концентрации глутамина в тканях мозга. В мозгу животных, переносящих инсулиновый шок, концентрация амидоазота глутамина снижалась по сравнению с контролем более чем в 2 раза. Казалось, что судорожное состояние при глубокой инсулиновой гипогликемии можно объяснить изменением концентрации в мозгу ГАМК. Известно, что уменьшение содержания в мозгу этой кислоты сопровождается судорожным состоянием. Однако шоковые дозы инсулина не оказывали влияния на изменения концентрации в мозгу ГАМК. Поэтому мы вынуждены были отказаться от мысли об ответственности концентрации ГАМК за состояние животного при инсулиновом шоке. Анализ данных, помещенных во вторую таблицу, свидетельствует о значительном уменьшении в тканях головного мозга в период инсулинового шока фонда ряда аминокислот. Это прежде всего относится к содержанию аланина, аргинина, глутаминовой кислоты, метионина, серина, треонина, цистина и тирозина. В то же время в головном мозгу крыс под влиянием инсулина почти не изменялась концентрация гистидина и глицина. Попутные определения в некоторых пробах содержания в мозгу пептидов, которые мы предприняли, демонстрировали снижение в мозгу концентрации пептидов с 1,820 мкМ/г в контроле до 0,510 мкМ/г свежей ткани мозга животных, находившихся в состоянии инсулинового шока. Отсюда можно сделать заключение, что одним из агентов, определяющих состояние инсулинового шока, является повышение образования аммиака, происходящего за счет более интенсивного распада аминокислот. Уменьшение концентрации последних в мозгу при инсулиновом шоке нельзя объяснить интенсивным их использованием для процессов биосинтеза белка.

Мы должны также сделать еще одно предположение о том, что большие дозы инсулина, усиливая катаболические процессы в белковом обмене, помимо усиления освобождения аммиака, могут приводить также к образованию других продуктов распада, обладающих токсическими свойствами. Возможно, что они совместно с аммиаком являются ответственными за возникновение судорожного состояния при введении животному больших доз инсулина. Уменьшение концентрации глутамина в мозгу при инсулиновом шоке свидетельствует о резком ослаблении биологических механизмов, обезвреживающих в тканях мозга избыточное содержание аммиака. Кроме того, процентное отклонение в концентрации различных аминокислот свидетельствует, что

обеднение аминокислотного фонда в мозговой ткани при инсулиновом шоке не происходит равномерно за счет всех аминокислот. Относительное, наиболее резкое уменьшение концентрации происходило в содержании аланина, цистина и треонина. Оно равнялось соответственно 70,0, 64,9 и 59,1%. Заметное уменьшение происходило также в концентрации аргинина и глютаминовой кислоты (42,5% и 41,3%). На одну треть сокращался фонд метионина (32,6%) и серина (33,6%), а фонд тирозина уменьшался лишь на одну пятую исходной концентрации (21,9%) и фактически не было отклонений в величинах фондов гистидина (—7,6%) и глицина (—4,7%).

### Выводы

1. Введение больших доз инсулина, сопровождающееся судорожным состоянием, характеризуется повышением концентрации в мозгу животных аммиака, уменьшением содержания глютамина и не влияет на концентрацию ГАМК.

2. В период развития инсулинового шока обедневает аминокислотный фонд мозга. Однако сокращение аминокислотного фонда в мозговой ткани при инсулиновом шоке происходит не равномерно за счет каждой свободной аминокислоты, находящейся в мозгу. Уменьшение концентрации одних аминокислот происходит в значительно больших размерах, чем снижение содержания других. В наших исследованиях такими полюсами в наблюдаемых отклонениях оказались аланин и глицин.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Weil-Mahlherbe H., In.: Neurochemistry, p. 321, Illinois, 1962.
2. Владимирова Е. А., Биохимия нервной системы. Киев, 25, 1954.
3. Арутюнян А. В., Микаэлян Э. М., Вопросы биохимии мозга, I, 113, 1964.
4. Seligson D., Seligson H., J. Lab. Clin. Med., 38, 324, 1951.
5. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А., Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
6. Giri K. V., Radharkrishnan A. N., Vaidyanathan C. S., J. Indian. Intst. science, 35, 145, 1953.
7. Bode F., Biochem. Ztschr., 256, 433, 1955.
8. Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П., Лабораторное дело, 3, 24, 1958.

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ГИПЕРОКСИИ

З. Г. Броновицкая, Т. Н. Погорелова, Г. В. Щербакова

Кафедра биохимии Ростовского-на-Дону государственного университета,  
Ростов-на-Дону

В нервной ткани имеется значительный фонд низкомолекулярных азотсодержащих соединений.

Роль фонда многообразна, но недостаточно ясна. Компоненты фонда являются источниками структурных элементов для построения высокомолекулярных соединений — белков, аминоклипидов, аминокполисахаридов и др. Из них также образуются биологически активные вещества — серотонин, ГАМК, КА, глутатион. Эти вещества в значительной степени определяют специфические функции и функциональное состояние нервной ткани.

Они являются хранителем активного аммиака в виде аминных и амидных групп. Наиболее активными N-содержащими соединениями, способными к активному перемещению, освобождению и связыванию аммиака, являются амиды, аминокислоты, аминокиспирты, аминоксахара и др.

Количественно в фонде низкомолекулярных N-содержащих веществ преобладают аминокислоты, они составляют 50% небелкового азота в ЦНС. Из общего количества аминокислот в ЦНС глутаминовая кислота, глутамин, аспарагиновая и ацетиласпарагиновая кислоты составляют 75%.

Ранее нами было установлено, что гипероксия вызывает заметные сдвиги в содержании отдельных аминокислот и тем большие, чем глубже кислородная интоксикация (1, 2). При судорожных приступах наибольшие сдвиги в составе аминокислот наблюдаются в полушариях большого мозга: увеличивается количество глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина и треонина. Уменьшается содержание глутамина, цистина, и особенно значительно снижается содержание ГАМК (1).

Сообщение Эллиота (3) о том, что часть аминокислот, обычно экстрагируемых из ткани спиртом, ТХУ и др. растворителями, находится в более прочной связи с высокомолекулярными соеди-



нениями нервной ткани, вызвало, естественно, вопрос о роли обнаруженных фракций аминокислот при изменении функционального состояния нервной системы.

Первый раздел нашей работы посвящен исследованию динамики связанных и свободных аминокислот в различных отделах головного мозга в норме и в период судорог, вызванных действием 6 атм. кислорода.

Экстракцию и разделение аминокислот вели по методу Эллиота (7). Гомогенизацию проводили солевым раствором следующего состава: 102 мл 0,154 М NaCl, 3 мл 0,154 М KCl, 1 мл 0,154 М  $MgSO_4$  и 20 мл буферного раствора одно- и двухзамещенного фосфата, pH 7,6. Гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 20000 g в течение 15 мин. при 0°С. Свободные аминокислоты определяли в надосадочной жидкости, связанные аминокислоты — в осадке. Все процедуры, начиная с декапитации животных, вели в холодной комнате при 0°С с охлажденными реактивами. Количественное определение аминокислот проводили комбинированным методом электрофореза и хроматографии на бумаге (4, 5). Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1.

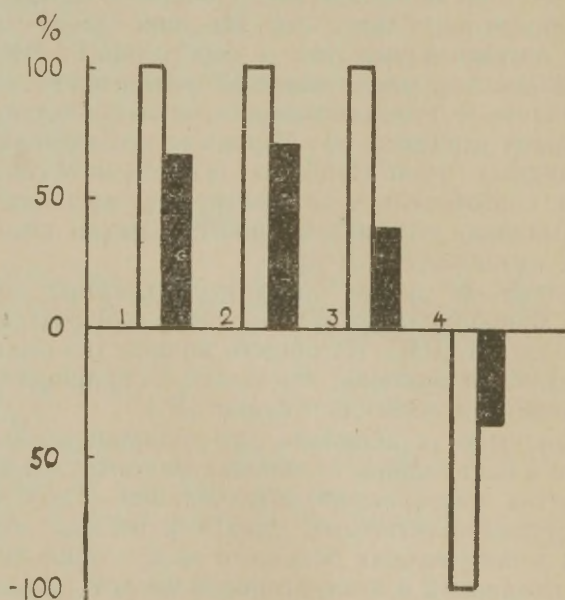


Рис. 1. Влияние гинероксии на динамику связанной и свободной форм аминокислот.

1 — глутаминовая кислота; 2 — аспарагиновая кислота; 3 — аланин; 4 — ГАМК. □ общий прирост; ■ связанные аминокислоты.

Содержание свободных и связанных аминокислот в отделах мозга кроликов при гипероксии  
(в мкМ/г свежей ткани)

Большие полушария

	Глутаминовая кислота			Г А М К			Аспарагиновая кислота			Аланин		
	Своб.	Связ.	Отно- шение	Своб.	Связ.	Отно- шение	Своб.	Связ.	Отно- шение	Своб.	Связ.	Отно- шение
Контроль	5,790 ±0,086	3,470 ±0,078	1,67	1,370 ±0,047	0,890 ±0,029	1,54	1,820 ±0,031	0,810 ±0,018	2,85	0,930 ±0,041	0,370 ±0,013	2,50
Опыт	6,370 ±0,080	4,180 ±0,110	1,52	0,970 ±0,027	0,720 ±0,030	1,34	2,000 ±0,041	1,030 ±0,025	1,94	1,100 ±0,041	0,470 ±0,019	2,34

Мозжечек

Контроль	5,660 ±0,107	2,240 ±0,049	2,52	1,520 ±0,050	0,490 ±0,013	3,10	1,780 ±0,033	0,640 ±0,016	2,78	0,740 ±0,021	0,260 ±0,009	2,85
Опыт	5,820 ±0,110	2,710 ±0,061	2,15	0,860 ±0,021	0,370 ±0,014	2,32	1,780 ±0,028	0,680 ±0,033	2,62	0,720 ±0,030	0,270 ±0,010	2,85

Продолговатый мозг

Контроль	5,550 ±0,069	1,990 ±0,050	2,79 —	1,330 ±0,038	0,530 ±0,010	2,50	1,710 ±0,046	0,590 ±0,017	2,90	0,740 ±0,027	0,240 ±0,012	3,08
Опыт	5,870 ±0,089	2,540 ±0,052	2,34	0,930 ±0,021	0,420 ±0,016	2,22	1,720 ±0,041	0,620 ±0,020	2,78	0,790 ±0,028	0,270 ±0,008	2,92

Отделы мозга отличаются соотношением свободных и связанных аминокислот. Содержание связанных аминокислот выше в больших полушариях, меньше — в мозжечке и еще меньше — в продолговатом мозгу. Содержание связанной глютаминовой кислоты по отношению к общему ее количеству в полушариях головного мозга составляет 37,4%, в мозжечке — 28,4%, в продолговатом мозгу — 26,4%. Из изученных аминокислот наиболее высоко содержание связанной формы ГАМК, оно равно 37,5 — 39,4%.

Гипероксия увеличивает содержание глютаминовой кислоты во всех отделах мозга главным образом за счет связанной формы. Поэтому отношение  $\frac{\text{свободные аминокислоты}}{\text{связанные аминокислоты}}$  уменьшается.

Увеличение аспарагиновой кислоты и аналина в больших полушариях мозга также происходит преимущественно вследствие увеличения содержания их связанной формы.

Уменьшение содержания ГАМК, наблюдаемое при гипероксии во всех отделах мозга, происходит вследствие снижения главным образом свободной формы. Особенно резко это проявляется в мозжечке, где количество свободной ГАМК уменьшается при гипероксии на 43%, а связанной — на 24%.

Связь аминокислот весьма непрочна, она разрушается при сдвиге pH и в кислую и в щелочную сторону, при замене ионов  $\text{Na}^+$  ионами  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , при повышении температуры, при обработке мозга гипотоническими растворами, органическими растворителями, SH-реагентами и др. (6, 7).

На основании полученных материалов трудно судить о функциональном значении исследованных форм аминокислот. Неизвестен характер связи, неизвестно с какими веществами взаимодействуют аминокислоты. Но сам факт, что гипероксия изменяет соотношение свободных и связанных аминокислот, говорит об изменении при этих условиях физико-химического состояния акцепторных групп высокомолекулярных соединений, через которые осуществлялось присоединение аминокислот.

Наиболее лабильными в условиях гипероксии оказались аминокислоты, непосредственно связанные с функцией цикла трикарбоновых кислот.

Интенсивность дыхания мозга крыс в этот период судорожной активности превышает норму на 26%.

Однако аминокислоты не являются субстратом дополнительного окисления, т. к. их общий уровень не только не снижается, но даже на 7—10% возрастает. Снижение уровня одних аминокислот компенсируется повышением содержания других, и прежде всего глютаминовой кислоты.

Различная направленность метаболизма отдельных аминокислот в условиях гипероксии определяется, по-видимому, их



биологическими особенностями и различной чувствительностью механизмов, регулирующих их обмен, к повышенному давлению кислорода.

Резкое возрастное содержание аммиака при гипероксии при сохранении или даже активировании дыхания привело к исследованию роли аминокислот в метаболизме мозга.

Известна высокая проницаемость мозга для аминокислот (8), способность глюкозамина поддерживать высокий уровень дыхания и фосфорилирования мозга. Срезы мозга животных, перенесших судорожный приступ, вызванный действием 6 атм.  $O_2$ , более энергично потребляют глюкозамин по сравнению со срезами мозга контрольных животных. Это можно объяснить активированием при гипероксии неспецифической гексокиназы, фосфорилирующей глюкозамин, и деаминазы глюкозамина. Складывается представление о том, что при гипероксии усиливается использование глюкозамина, добавляемого к мозгу (9).

Однако более непосредственная взаимосвязь обмена глюкозамина с аминокислотами изучена недостаточно (10).

Мы исследовали в опытах *in vitro* влияние глюкозамина, добавляемого к инкубируемому срезу мозга крыс, на содержание аммиака, глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагиновой кислоты и ГАМК. Для сравнения ставили контрольные опыты, в которых к инкубированным срезам добавляли глюкозу.

Содержание названных компонентов определяли совместно в срезах и инкубационной жидкости. Срезы инкубировали в сосудах Варбурга, в фосфатно-солевой буферной смеси (рН 7,4), 30 мин. при  $28,2^\circ C$ . Конечная концентрация глюкозамина и глюкозы была 11 мкМ. Опыт прекращали добавлением 12% ТХУ, срезы гомогенизировали, гомогенат центрифугировали и исследовали надосадочную жидкость.

Аммиак определяли микродиффузионным методом Селигсона (11) с окраской реактивом Несслера. Колориметрировали на ФЭК-Н при 413 мкм. Аминокислоты и глюкозамин разделяли по Дозе (4). Для количественной оценки готовили стандартные кривые для всех аминокислот и глюкозамина. Глутамин определяли по аммиаку, освобожденному после 10 мин. гидролиза в 1 н  $H_2SO_4$ . Результаты обработаны статистически. Они представлены в табл. 2 и на рис. 2.

Полученные материалы показывают, что использование глюкозамина, по сравнению с глюкозой, изменяет динамику исследованных веществ: повышается значительно содержание аммиака и аспарагиновой кислоты, снижается прирост глутаминовой кислоты и ГАМК и понижается уровень глутамина.

Накопление аммиака, казалось бы, должно увеличивать содержание глутамина, а окислительный распад глюкозамина, поддерживающий высокий уровень дыхания, должен был бы поддерживать уровень глутаминовой кислоты, соответствующий

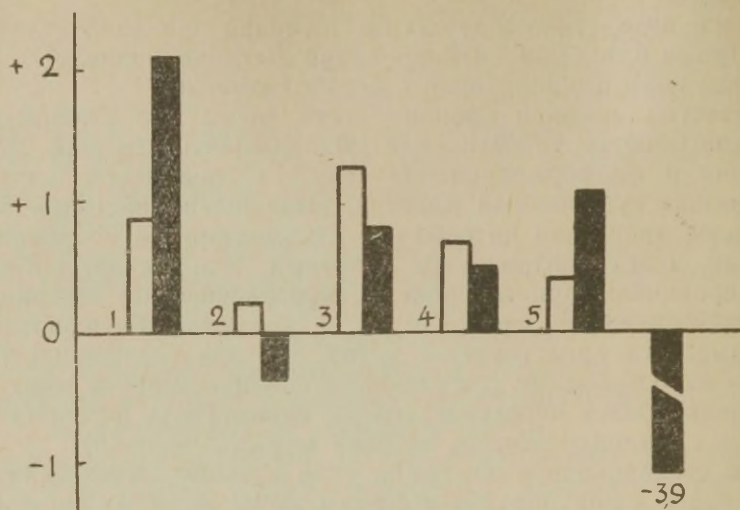


Рис. 2. Влияние глюкозамина и глюкозы на динамику некоторых N-компонентов при инкубировании срезов мозга (в мкМ/г свежей ткани за 30 мин.,  $T = 28,2^\circ$ ).

1 — аммиак; 2 — глутамин; 3 — глутаминовая кислота; 4 — ГАМК; 5 — аспарагиновая кислота; □ — глюкоза; ■ — глюкозамин.

Таблица 2

Влияние глюкозамина на динамику аминокислот в инкубируемых срезах мозга в мкМ/г св. ткани за 30 мин.

	NH <sub>3</sub>		Глутамин		Глутамин. к-та		ГАМК		Аспарагин. к-та	
	Глю-коза	Глю-коз-амин	Глю-коза	Глю-коз-амин	Глю-коза	Глю-коз-амин	Глю-коза	Глю-коз-амин	Глю-коза	Глю-коз-амин
Неинкуб. пробы	3,41	4,12	0,51	0,51	7,61	7,61	2,76	2,76	2,29	2,29
Инкуб. пробы	4,12	6,29	0,56	0,31	8,76	8,20	3,24	3,08	2,41	3,14
Изменение	+0,70	+2,17	+0,05	-0,20	+1,15	+0,59	+0,48	+0,32	+0,12	+0,85
P	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

ее синтезу при потреблении глюкозы, однако система аммиак-глутамин-глутаминовая кислота не функционировала обычным способом.

Главным механизмом преобразования аминокислот и переноса аммиака в мозгу является переаминирование в системе, состоящей из кетокислот и донатора аммиака.

Донаторами аминокрупп могут быть многие аминокислоты, амиды, амины (в частности кадаверин и путресцин), тиреоидные гормоны (12), аминсахара (13, 14). Карбоксильная группа, как известно, не является обязательным компонентом структуры донатора аминокрупп.

Мы исследовали способность гомогената мозга крыс, приготовленного преимущественно из коры головного мозга, синтезировать глутаминовую кислоту в присутствии  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты и глюкозамина у контрольных животных после действия на них 6 атм. кислорода.

Наиболее активно синтез протекает при использовании реакционной смеси, предложенной Пандольфо и др. (13), отличающейся низкими концентрациями реагирующих компонентов. Использование многих прописей, предложенных для исследования реакций переаминирования, было менее эффективным. Это определяется, по-видимому, тем, что большинство прописей рекомендует высокие концентрации обоих компонентов и предусматривает содержание донатора аминокруппы, в 5 и 25 раз более высокое по сравнению с кетокислотой. Количественную оценку интенсивности трансаминирования мы вели по приросту глутаминовой кислоты и уменьшению глюкозамина.

Состав реакционной смеси: 1. 0,5 мл гомогената 1; 10 в 1/15 М фосфатном буфере;  
2. 1,5 мл фосфатного буфера, содержащего:  
8 мкМ  $\alpha$ -кетоглутаровой к-ты,  
6 мкМ глюкозамина,  
0,4 мкМ фосфопиридоксала.

Инкубирование вели в термостате при 37°С в течение одного часа. Контрольные пробы и пробы после инкубирования фиксировали на холоду прибавлением 1 мл охлажденного этилового спирта. После центрифугирования в надосадочной жидкости определяли содержание аминокислот и глюкозамина.

Параллельно работе с полной реакционной смесью был поставлен ряд контрольных проб с прокипяченным гомогенатом, инкубированным гомогенатом, гомогенатом с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, гомогенатом с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой и глюкозамином и в последнем варианте также с фосфопиридоксалем (ФП). Полученные результаты представлены на рис. 3.

Сопоставление прироста глутаминовой кислоты в пробах с добавлением глюкозамина и без него говорит о том, что глю-



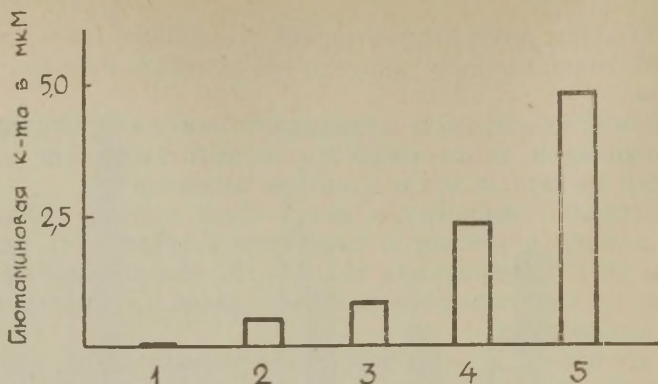


Рис. 3. Прирост глютаминовой кислоты в инкубируемых гомогенатах мозга крыс.

1 — гомогенат; 2 — гомогенат; 3 — гомогенат +  $\alpha$ -кетоглутарат (8 мкМ); 4 — гомогенат +  $\alpha$ -кетоглутарат (8 мкМ) + глюкозамин (6 мкМ); 5 — гомогенат +  $\alpha$ -кетоглутарат + глюкозамин + ФП (0,4 мкМ).

козамин является источником аминной группы глютаминовой кислоты. Заметное активирование реакции ФП позволяет считать, что имеет место реакция переаминирования.

Эти опыты подтвердили результаты исследований Пандольфо и Мационе.

Ряд опытов мы поставили на мозге новорожденных крыс. Результаты показали, что фермент реакции глюкозамин  $\rightarrow$   $\alpha$ -кетоглутаровая кислота неактивен в этом возрасте. В то же время известно, что синтез глюкозамина в мозгу наиболее интенсивно протекает в эмбриогенезе и резко снижается в первые дни постнатальной жизни (15).

По-видимому, с возрастом параллельно снижению синтеза глюкозамина совершенствуются и расширяются пути вовлечения глюкозамина в регуляцию обмена аминокислот. С возрастом в мозгу повышается активность и других трансаминаз, повышается активность цикла трикарбоновых кислот.

Действие гипероксии на активность трансаминазы реакции глюкозамин  $\rightarrow$   $\alpha$ -кетоглутаровая кислота изучалось *in vivo* и *in vitro*. В опытах *in vivo* крыс подвергали действию 6 атм.  $O_2$  до развития у них судорожного приступа. Животных затем декапировали, из мозга приготавливали гомогенат, и дальнейшую работу вели, как описано на стр. 155. В опытах *in vitro* гомогенат мозга контрольного животного с необходимыми добавками подвергали 1-часовому воздействию 6 атм. кислорода, параллельную пробу инкубировали на воздухе, затем в обоих пробах определяли содержание глютаминовой кислоты и глюкозамина. Было проведено 10 определений. Результаты представлены на рис. 4.

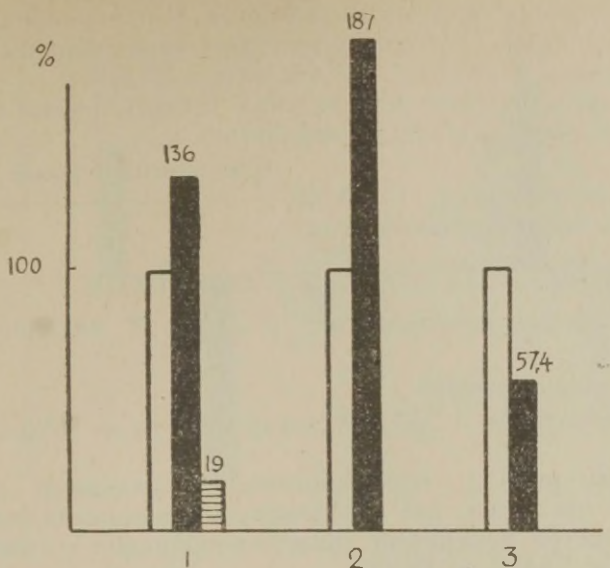


Рис. 4. Влияние 6 атм. O<sub>2</sub> на активность трансаминаз (в мкМ глютам. к-ты/г свежей ткани за 1 час).

1 — глюкозамин + α-кетоглутарат; 2 — ГАМК + α-кетоглутарат; 3 — ГАМК + оксальацетат; □ контроль; ■ O<sub>2</sub> *in vivo*; ▨ O<sub>2</sub> *in vitro*.

Действие гипероксии в опытах *in vivo* и *in vitro* оказывало противоположный эффект: *in vivo* активность фермента возрастала на 36%, в опытах *in vitro* — ингибировалась на 81%.

Действие трансаминаз помимо ФП связано с состоянием SH-групп апофермента (16).

Торможение активности ферментов, действие которых связано с SH-группами, при непосредственном воздействии повышенного давления кислорода на препараты мозга наблюдали многие исследователи (17, 18). Это явилось основанием для появления гипотезы, рассматривающей токсическое действие кислорода под повышенным давлением как результат окисления SH-групп ферментов.

Однако, в опытах *in vivo* активность некоторых из этих ферментов сохранялась и даже возрастала, напр. АТФазы.

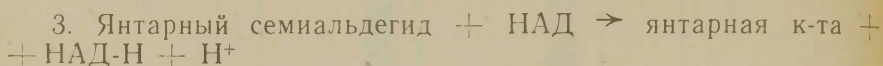
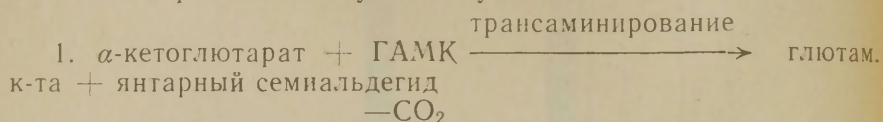
Клеточные структуры и регуляция обмена веществ в клетках неповрежденного мозга предохраняют ряд ферментов от токсического действия избытка кислорода.

Таким образом и трансаминаза наряду с гексокиназой и деаминазой активируется при гипероксии.

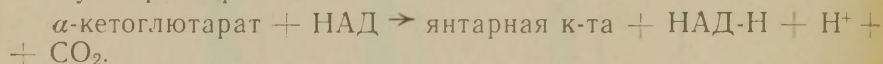
Трансаминаз реакции глюкозамин → ЩУК и глюкозамин → пируват в мозгу крыс разного возраста не обнаружено.

Специфичным для мозга является функционирование шунтового механизма, связывающего цикл трикарбоновых кислот с метаболизмом глутаминовой кислоты и ГАМК.

Считают (19), что значительная часть глюкозы в процессе окисления проходит следующий путь:



Суммарная реакция:



Важная роль в нем принадлежит реакциям переаминирования, тем более, что и образование аспарагиновой кислоты обеспечивается реакциями трансаминирования с глутаминовой кислотой и ГАМК на ЩУК.

Мы исследовали влияние гипероксии на активность трансаминаз реакции  $\text{ГАМК} \rightarrow \alpha\text{-кетоглутарат}$  и  $\text{ГАМК} \rightarrow \text{ЩУК}$  в мозгу.

Животных подвергали действию 6 атм. кислорода до появления судорожного приступа, т. е. в таких же условиях, как и в предыдущих разделах работы. Животных декапитировали, из мозга готовили водный гомогенат в соотношении 1:4 (20). Состав инкубационной смеси: 0,4 мл гомогената; 0,7 мл боратного буфера (рН 8,2, в реакции со ЩУК — 7,4); 2,0 мкМ кетоглутарата или ЩУК; 2 мкМ ГАМК; 0,4 мкМ ФП и 0,3 мл  $\text{H}_2\text{O}$ . Пробы инкубировали один час при  $38^\circ\text{C}$ , реакцию прекращали добавлением 12% ТХУ. Показателем активности ферментов был прирост глутаминовой кислоты или соответственно аспарагиновой и уменьшение ГАМК.

Результаты, полученные для контрольных животных, были проверены и подтверждены опытами, в которых источниками фермента служили ацетоновые препараты мозга. Результаты представлены на рис. 4 и 5.

Как видно из полученных материалов, при гипероксии активность трансаминазы реакции  $\text{ГАМК} \rightarrow \text{ЩУК}$  ингибируется, в то время как трансаминаза реакции  $\text{ГАМК} \rightarrow \alpha\text{-кетоглутаровая кислота}$  значительно активируется.

Уменьшение уровня ГАМК при гипероксии может быть в известной степени результатом ингибирования декарбоксилазы глутаминовой кислоты (2, 21) и, как мы установили в настоящем исследовании, активирования вышеуказанной трансаминазы.



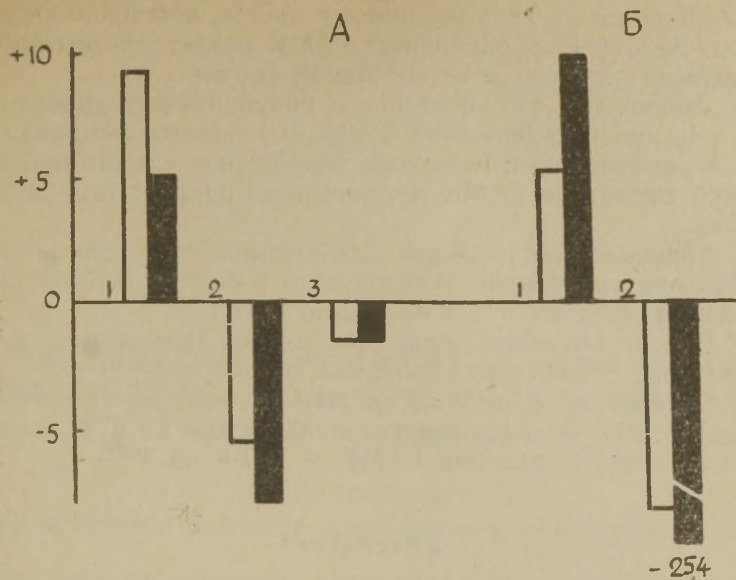


Рис. 5. Участие ГАМК в реакциях трансаминирования (в мкМ/1 г свежей ткани за 1 час, Т 38°).

А. ГАМК + оксальцетат: 1 — аспарагиновая кислота; 2 — ГАМК; 3 — глутаминовая кислота. Б. ГАМК + α-кетоглутарат: 1 — глутаминовая кислота; 2 — ГАМК. □ — контроль; ■ — O<sub>2</sub> (6 атм.).

Эти же механизмы, вместе с ингибированием глютаминсинтеза (22), могут быть ответственными за увеличение содержания глютаминовой кислоты при повышенном давлении кислорода.

Сопоставление динамики ГАМК при действии кислорода под повышенным давлением и ряда конвульсантов заставило Вуда с сотр. в их последней работе (23) отказаться от предположения, что снижение уровня ГАМК в синапсах является единственным механизмом возникновения судорожных приступов и основной причиной кислородной интоксикации.

Результаты настоящего исследования подчеркивают, что, несмотря на сохранение и даже усиление интенсивности дыхания при гипероксии, связанные с ним шунтовые механизмы претерпевают значительные сдвиги и это может иметь существенное значение в нарушении деятельности нервных клеток.

### Выводы

1. Гипероксия изменяет абсолютное содержание некоторых аминокислот в отделах мозга и соотношение между их свободной и связанной формами. Увеличение количества аминокислот

осуществляется за счет увеличения преимущественно связанной формы, уменьшение содержания ГАМК характеризуется преимущественным снижением ее свободной формы.

2. Добавление глюкозамина к инкубируемым срезам мозга крыс повышает содержание в них свободного аммиака, понижает, по сравнению с глюкозой, содержание глутамина, глутаминовой кислоты и ГАМК, но повышает прирост аспарагиновой кислоты.

3. Трансаминаза реакции глюкозамин  $\rightarrow$   $\alpha$ -кетоглутаровая кислота при гипероксии активируется в опытах *in vivo* на 36%, но ингибируется на 81% в опытах *in vitro*.

4. В мозгу не обнаружено присутствия трансаминаз реакции глюкозамин  $\rightarrow$  ЩУК и глюкозамин  $\rightarrow$  пируват.

5. Гипероксия в опытах *in vivo* активирует трансаминазу реакции ГАМК  $\rightarrow$   $\alpha$ -кетоглутаровая кислота на 87%, но тормозит трансаминазу реакции ГАМК  $\rightarrow$  ЩУК на 42%.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Погорелова Т. Н., ДАН СССР, **167**, 6, 1421—1422, 1966.
2. Щербакова Г. В., ДАН СССР, **146**, 5, 1213—1215, 1962.
3. Elliot K. A. C., Dahl D. R., Balazs R., Biochem. J., **90**, 42, 1964.
4. Dose K., Biochem. J., **329**, 416, 1957.
5. Пасхина Т. С., Методическое письмо, в. 1, М, 1959.
6. Gaitonde M. K., Dahl D. R., Elliott K. A., Biochem. J., **94**, 2, 345, 1965.
7. Elliott K. A. C., Kahn R., Tarig, Bulodeau F., Lovell R. A., Canad J., Biochem., **43**, 3, 407, 1965.
8. Geiger A., Physiol. Rev., **38**, 1, 1—19, 1958.
9. Броницкая З. Г., Румянцев Л., III Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 1963.
10. Броницкая З. Г., Любелская Е. Н., Из сб. «Химия и обмен углеводов», Москва, 158—164, 1965.
11. Seligson D., Seligson H., J. Lab. Clin. and Med., **38**, 324, 1951.
12. Nakano Minoru, Damowski T. S., Biochim. et biophys. acta, **85**, 1, 18—28, 1964.
13. Pandolfo L., Macaione S., Boll. Soc. Ital. biol. sperim., **37**, 17, 837—838, 1961.
14. Pandolfo L., Macaione S., Giorn. Biochem., **13**, 4, 262—273, 1964.
15. Canal N., Fratolla L., Internat. Neurochem. Sympos. on Enzymic Activity of the Central Nervous System, Copenhagen, 1962.
16. Поляновский О. Л., Биохимия, **27**, 4, 1962.
17. Dickens F., Biochem. J., **40**, 145, 1945.
18. Stadi W., Riggs B., Haugaard N., J. Biol. Chem., **160**, 191, 1945.
19. Balazs R., J. Neurochem., **12**, 2, 63, 1965.
20. Roberts E., Bregoffi H. M., J. Biol. Chem., **101**, 393, 1953.
21. Wood Y. D., Watson W. Y., J. Neurochem., **12**, 7, 663, 1965.
22. Гершенович З. С., Кричевская А. А., Биохимия, т. 21, вып. 6, 715—722, 1956.
23. Wood Y. D., Watson W. Y., Stacey N. E., J. Neurochem., **13**, 5, 361—370, 1966.

## О ДИНАМИКЕ ОБМЕНА АММИАКА, ГЛЮТАМИНА И АМИДНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ МОЗГА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АКТГ И КОРТИЗОНА

А. К. Тяхепыльд

Кафедра биохимии Тартуского государственного университета, Тарту

Если влияние гормонов гипофизарно-адреналовой системы на различные звенья обмена веществ в организме подвергалось разностороннему исследованию, то гораздо меньше внимания уделено изучению метаболических сдвигов в нервной ткани под действием кортикостероидов и, в частности, АКТГ. Только в последние годы накопились данные о динамике водно-солевого (1—4) и углеводно-фосфорного обмена (5, 6) в мозгу под действием кортикостероидов, а также был проведен электроэнцефалографический анализ функционального состояния ЦНС, развиваемого в ответ на введение этих гормонов (6—10). В ряде работ были изучены изменения азотистого обмена на уровне низкомолекулярных метаболитов мозга (3, 11—13).

Однако интерпретация полученных результатов часто затрудняется тем, что отдельные виды животных и даже отдельные животные, по данным электрофизиологического и условнорефлекторного анализов, по-разному реагируют на действие одного и того же гормона. Особенно затруднительно изучение влияния АКТГ вследствие сложности механизмов реализации его действия.

Исходя из представления об аммиаке, как о тонком биохимическом показателе функционального состояния ЦНС (14—16), а также о роли обратимого амидирования белков как в обмене аммиака, так и в возможных физико-химических изменениях самих белков (17, 18), нами изучалась динамика обмена аммиака, глютамина, амидных групп белков и физико-химическое состояние белков по свободным сульфгидрильным группам и дифференциальным УФ-спектрам под действием АКТГ и кортизона.



Опыты ставились на крысах-самцах весом 180 г и на морских свинках обоего пола весом 400—600 г. Кортизон вводился внутримышечно в дозе 5 мг на крысу в остром опыте и по 5 мг на крысу ежедневно в течение 9—11 дней в хронических опытах. АКТГ вводился однократно внутримышечно в дозе 4 и 30 МЕ на 1 кг веса тела. Морские свинки умерщвлялись декапитацией и моментально погружали голову в жидкий азот, а крысы замораживались целиком. Всегда параллельно ставился контрольный опыт с введением 0,9% NaCl.

Свободный  $\text{NH}_3$  и  $\text{NH}_3$ , отделившийся от глутамина после 11-минутного гидролиза ТХУ-экстрактов мозга с 2 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , определяли по Парнасу. Амидные группы белков мозга определяли по ранее описанной методике (17).

Для определения SH-групп белков из мозгового порошка приготавливали экстракт по А. В. Палладину и Н. М. Поляковой (19), содержащий растворимые в физиологическом растворе белки. В экстракте определяли количество белков по Лоури (20) и количество SH-групп спектрофотометрическим методом с р-хлормеркурибензоатом (21). Синтез р-хлормеркурибензоата производился по А. Н. Несмеянову и Л. Г. Макаровой (22).

Дифференциальные УФ-спектры снимали по Д. Унгару (23), выравнивая перед снятием спектров концентрации белка в экстрактах от контрольных и подопытных животных.

## Полученные результаты и их обсуждение

Опыты на крысах с однократным введением кортизона показали, что через 2,5 часа после введения в мозг происходит статистически достоверное увеличение количества свободного преформированного аммиака и глутамина (рис. 1). Эти результаты находятся в соответствии с данными В. П. Комиссаренко и В. С. Лусенко (11) и Вудбери с сотр. (3) об увеличении в мозгу аммиака и глутамина под действием кортизона и говорят в пользу повышения нервной активности. Действительно, о повышении нервной активности в ответ на введение кортизона свидетельствуют как клинические наблюдения, так и электрофизиологические данные (4, 24—26).

На основании полученных данных возникает вопрос об источниках увеличения аммиака в мозгу. Как показали наши определения, количество амидного азота белков не изменяется (рис. 1), хотя у отдельных животных было отмечено усиленное дезамидирование, но в то же время у других, наоборот, амидирование.

Однако в этих условиях опыта увеличивается количество аммиака в крови (рис. 1). Возможно, поэтому, что источником увеличения аммиака в мозгу является экзогенный аммиак крови вследствие усиления аммиакообразования в других тканях, в частности в мышцах. Не исключена также возможность увеличения количества аммиака за счет других источников в самом мозгу (адениловая система).

Сульфгидрильные группы растворимых белков мозга показали лишь тенденцию к увеличению (рис. 1), что оказалось

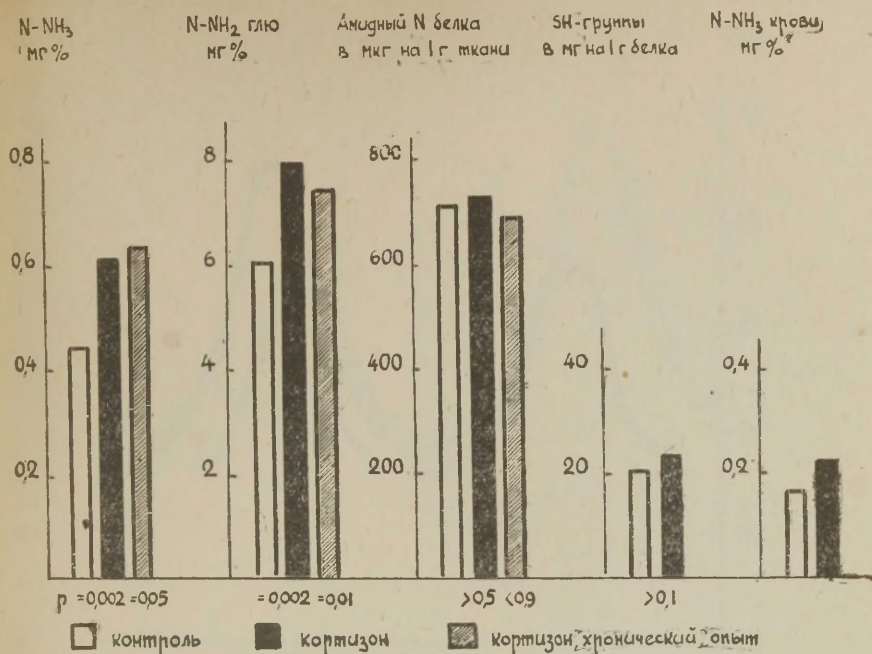


Рис. 1. Влияние одно- и многократного введения кортизона на содержание  $\text{NH}_3$ , глутамина, амидных и сульфгидрильных групп белков мозга и аммиака в крови.

статистически не достоверным. Не было установлено изменений также в дифференциальных УФ-спектрах (рис. 2).

При хроническом введении кортизона в течение 9—11 дней в этих изученных показателях была установлена такая же картина, как и при однократном введении: количество аммиака и глутамина увеличивается, амидный азот белков, сульфгидрильные группы и дифференциальные УФ-спектры не изменяются (рис. 1, 3). Увеличение количества аммиака и повышение нервной активности было найдено и другими авторами (13, 27).

Интересно отметить, что при однократном введении кортизона в таких же сравнительных дозах морским свинкам не было обнаружено никаких изменений в обмене аммиака, глутамина и амидных групп белков мозга.

Таким образом в наших опытах влияние кортизона на обмен аммиака имеет видовые различия — проявляется на крысах и не проявляется на морских свинках. В свою очередь, у крыс увеличение количества аммиака происходит не за счет амидных групп белков. Не изменяются также сульфгидрильные группы и дифференциальные УФ-спектры растворимых белков мозга.

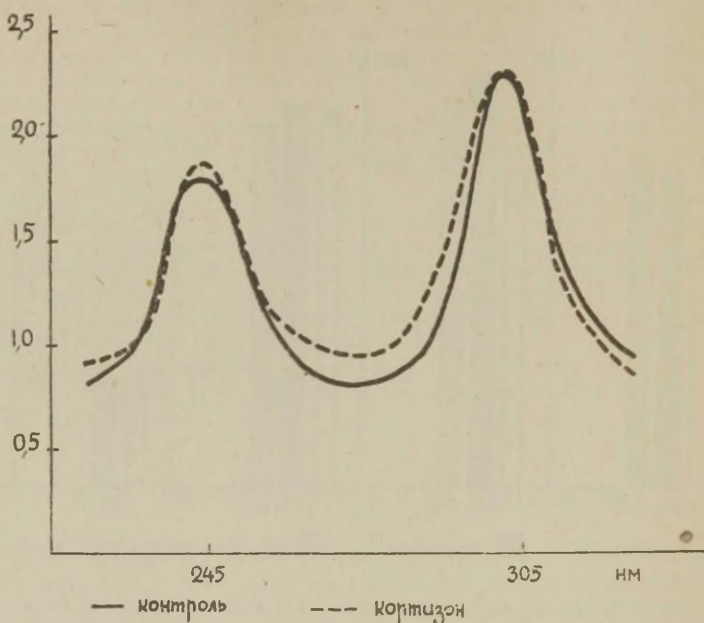


Рис. 2. Дифференциальные УФ-спектры поглощения при однократном введении кортизона.

В следующих опытах нами изучалось влияние внутримышечного введения АКТГ на те же показатели азотистого обмена мозга. Оказалось, что под действием 4 МЕ АКТГ на 1 кг веса через 2,5 часа в обмене аммиака можно уловить 3 типа изменений: у одних животных наблюдается выраженное увеличение количества аммиака и некоторое увеличение количества глутамина (рис. 4), у других не было найдено заметных изменений в этих компонентах, а у третьей группы было найдено уменьшение количества аммиака, которое, однако, оказалось статистически не достоверным. Таким образом, в обмене аммиака нам не удалось выявить закономерных изменений, что может явиться проявлением индивидуальной реакции животных на введение АКТГ. Противоречивые данные влияния АКТГ на азотистый обмен мозга можно найти и в литературе (9, 10, 24, 28—30).

Однако под действием АКТГ в дозе 30 МЕ было найдено закономерное, статистически достоверное увеличение количества амидных групп белков (рис. 4), что свидетельствует об участии белков в связывании аммиака под действием АКТГ.

В количестве сульфгидрильных групп наблюдалась тенденция



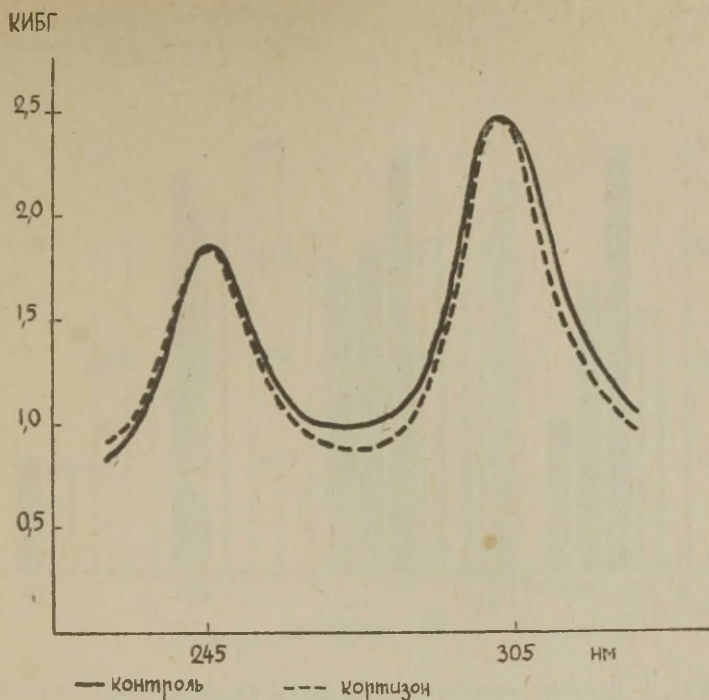


Рис. 3. Дифференциальные УФ-спектры поглощения при многократном введении кортизона.

к повышению, которая, однако, оказалась статистически не достоверной (рис. 4).

При введении АКТГ в дозе 30 МЕ на кг веса через 4 часа были получены более однотипные и при этом более выраженные сдвиги в обмене аммиака, глутамина и амидных групп белков мозга (рис. 5). Оказалось, что в этом случае количество глутамина заметно уменьшается, количество аммиака и амидных групп увеличивается. Возможно, что действие АКТГ проявляется прежде всего в нарушении синтеза глутамина.

В дифференциальных УФ-спектрах поглощения в ряде случаев были установлены заметные изменения, в то время как у других животных они оказались неизменными.

Следует подчеркнуть, что под действием АКТГ в дозе 4 и 30 МЕ как по азотистому обмену, так и по физико-химическому состоянию белков отдельные животные дают весьма выраженную экстремальную реакцию. У других же животных эффект АКТГ на изученные показатели остается слабо выраженным. Это еще раз говорит об индивидуальной реакции отдельных животных на АКТГ и может быть объяснено различными механиз-

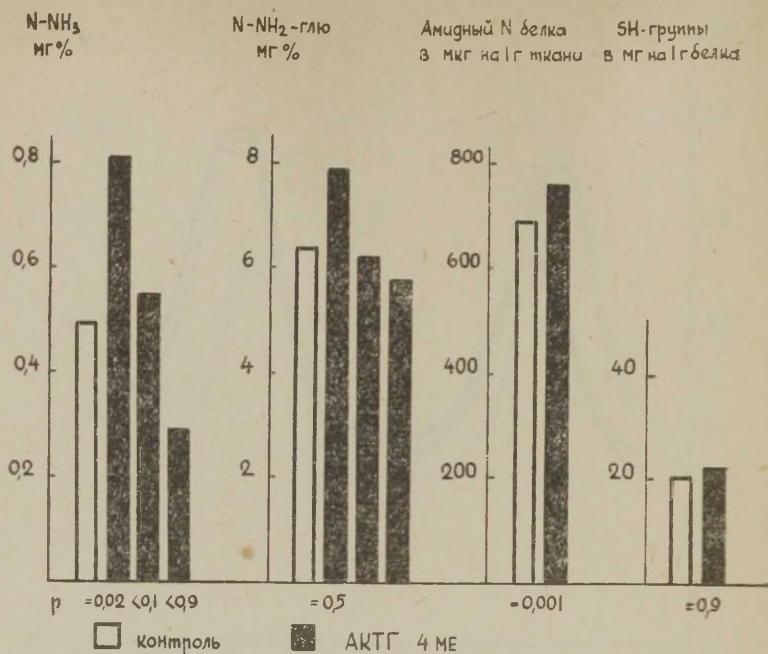


Рис. 4. Влияние введения 4 МЕ АКТГ на содержание  $NH_3$ , глутамина, амидных и сульфидрильных групп белков мозга.

мами и путями реализации этого влияния. Фазовость во влиянии АКТГ и индивидуальная реакция животных отмечены и в литературе (31—34).

С другой стороны, при сравнении влияния кортизона и АКТГ на азотистый обмен мозга, в частности на степень амидирования и физико-химическое состояние белков мозга, невольно напрашивается мысль о том, что АКТГ в наших условиях может оказать влияние на эти изученные показатели не только через кору надпочечников, но и непосредственно.

В пользу такого предположения говорит и факт, что у морских свинок кортизон не оказал влияния на изученные показатели, в то время как АКТГ в частности в дозе 30 МЕ проявил заметные сдвиги как в обмене аммиака, так и в физико-химическом состоянии белков.

### Выводы

1. Кортизон при однократном и повторном введении у крыс вызывает заметное увеличение количества аммиака и глутамина в мозгу и аммиака в крови. Белки мозга при этом не участвуют

$N-NH_2$   
мг%

$N-NH_2$ -ГЛЮ  
мг%

Амидный N белка  
в мкг на 1 г ткани

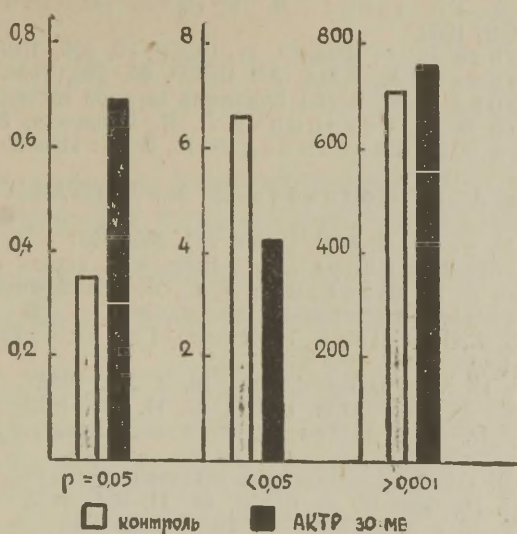


Рис. 5. Влияние введения 30 МЕ АКТГ на содержание аммиака, глутамина и амидных групп белков мозга.

в процессе аммиакообразования. У морских свинок кортизон не оказывает влияния на азотистый обмен мозга.

2. Под действием АКТГ в дозе 4 МЕ на 1 кг веса в обмене аммиака и глутамина у морских свинок наблюдаются изменения, отражающие индивидуальный характер реакции животных. Белки мозга при этом участвуют в связывании аммиака.

3. Большие дозы АКТГ (30 МЕ/кг веса) вызывают усиленное аммиакообразование за счет дезамидирования глутамина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Seller M. J., Spector R. G., J. Endocrinol. 25, 1, 115, 1962.
2. Левченко М. Н., Укр. фізіол. ж., 10, 1, 75, 1964.
3. Woodbury D. M., Timiras P. S., Vernadakis A., Hormones, brain function and behavior, 27, 1957.
4. Woodbury D. M., Recent Progr. Hormone Res., 10, 65, 1954.
5. Neascu C. et al., Commun. Acad RPR, 13, 1, 95, 1963.
6. Hoagland H., Neurochemistry, Sec. ed., 954, 1962.
7. Koefer P. F. A. et al., Proc. First Clinical ACTH Conf. 536, 1950.
8. Dorfman A. et al., J. A. M. A., 146, 1, 25, 1951.
9. Torda C., Wolff H. G., Am. J. Physiol., 168, 406, 1952.



10. Herz A. et al., Pflügers Archiv, 272, 442, 1961.
11. Комиссаренко В. П., Лусенко В. С., Первый Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы докладов, вып. 1, 170, 1964.
12. Комиссаренко В. П., В сб.: Совр. вопр. эндокринол., 30, 1960.
13. Юдаев Н. А., Гончарова В. Н., Пробл. эндокринол. и гормонотерапии, 5, 2, 3, 1959.
14. Владимирова Е. А., Физиол. ж. СССР, 25, 930, 1938.
15. Владимирова Е. А., Докл. АН СССР, 95, 905, 1954.
16. Владимирова Е. А., В сб.: Биохимия нервной системы, 47, 1954.
17. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Биохимия, 26, 984, 1961.
18. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., В сб.: Проблемы нейрохимии, 46, 1966.
19. Палладин А. В., Полякова Н. М., Докл АН СССР, 107, 568, 1956.
20. Lowry O. H. et al., J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
21. Рубина Х. М., Романчук Л. А., Вопр. мед. химии, 7, 652, 1961.
22. Несмеянов А. Н., Макарова Л. Г., Ж. общей химии, 1, 598, 1931.
23. Ungar G. et al., J. Gen. Physiol. 40, 635, 1956.
24. De Salva S. J. Hendley C. D., Ercolli N., Arch. internat. Pharmacodyn., 100, 1, 35, 1954.
25. Woodbury D. M., Pharmacol. Rev., 10, 2, 275, 1958.
26. Николов Н. А., Физиол. ж. СССР, 42, 11, 925, 1956.
27. Woodbury D. M., Sayers G., Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 75, 398, 1950.
28. Лусенко В. С., В сб.: Механизм действия гормонов, 222, 1959.
29. Пышина С. П., Физиол. ж. СССР, 42, 11, 931, 1956.
30. Валуева Т. К. и др., Физиол. ж., 10, 3, 322, 1964.
31. Сейфулла Х. И., Фармакол и токсикол., 24, 3, 267, 1961.
32. Васильева В. В., Сейфулла Х. И., X съезд Всесоюзн. физиол. общества им. Павлова. Тезисы научных сообщений, II, вып. I, 1964.
33. Ercolli N., De Salva S. J., Arch. int. Pharmacodyn., 108, 1, 62, 1956.
34. Woodbury D. M., Sayers G., Fed. Proc. 11, 398, 1952.

## О НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СДВИГАХ В МОЗГОВОЙ ТКАНИ ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ

Н. Б. Козлов, Е. С. Розанова, Н. М. Стунжас, Е. А. Шмаков

Кафедра биохимии Смоленского медицинского института, Смоленск

Изучение влияния высокой температуры на животный организм является одной из важнейших задач медицинской науки настоящего времени. С действием высокой температуры постоянно встречаются рабочие горячих цехов, котельных; эта проблема представляется важной и в связи с освоением космоса; она же имеет и определенное оборонное значение.

В клинике теплового удара (перегревания) видное место занимают симптомы, свидетельствующие о поражении ЦНС. У пострадавших нередко отмечается обморочное состояние с более или менее глубокой потерей сознания, появляются судорожные подёргивания, иногда развиваются настоящие, резко выраженные судороги, наблюдаются тетанические кризы, нистагм, расширение или сужение зрачков. В некоторых случаях отмечается бред, галлюцинации, двигательное возбуждение.

При вскрытии погибших от теплового удара находят отёк мозга и мозговых оболочек, перерождение и распад нервных клеток головного мозга, особенно в гипоталамической области и в области четвертого желудочка, петехиальные кровоизлияния в мозговую ткань (1—3).

Все это заставляет считать, что поражение жизненно важных нервных центров является одной из важнейших причин смерти при тепловом ударе.

Совершенно очевидно, что наблюдающиеся у пострадавших клинические проявления, свидетельствующие о нарушении функции центральной нервной системы, связаны с определенными биохимическими сдвигами, наступающими в мозговой ткани в процессе перегревания. Очевидно также и то, что грубые морфологические нарушения, отмечаемые у погибших от теплового удара, наступают не сразу. Им предшествуют определенные функциональные сдвиги, определенные изменения в обмене веществ.

Между тем, в литературе почти нет указаний о биохимических изменениях, происходящих в мозговой ткани при перегревании. Имеющиеся единичные, разрозненные сообщения не могут дать необходимых сведений по существу вопроса (4, 5). Знание же их представляется важным не только в чисто теоретическом отношении, но и для практики здравоохранения.

Это и побудило нас заняться указанным вопросом.

Опыты ставились на крысах. Нагревание животных осуществлялось в тепловой камере при температуре 45°C. Чтобы проследить развитие биохимических сдвигов в динамике, все подопытные животные были разбиты на 5 групп. Первая группа крыс служила контролем. Вторая группа крыс нагревалась в камере в течение 30 минут. В этот период животные находились в состоянии некоторого возбуждения, ректальная температура повышалась обычно на 2—3° и достигала 40—41°C. После взятия из тепловой камеры, животные декапитировались. Крысы третьей группы брались из тепловой камеры в состоянии теплового удара. Ректальная температура у таких животных достигала обычно 42—43°C. Декапитация их осуществлялась сразу же после взятия из камеры. Крысы четвертой группы брались из камеры также в состоянии теплового удара, но декапитация их осуществлялась непосредственно перед гибелью, т. е. через 15—60 минут после нагревания. Если состояние крыс после взятия из тепловой камеры не ухудшалось, декапитация их осуществлялась через 2 часа после нагревания. Эти крысы отнесены к 5 группе.

В мозговой ткани определялось содержание гликогена (свободной и связанной фракций), АТФ, КФ, НФ, аммиака, глутамина, амидных групп белков (легкогидролизуемой и прочно-связанной фракций). Все операции по обработке мозга проводились в растворах с температурой от 0° до 4° С. При определении содержания аммиака и глутамина в мозговой ткани крысы уби-

Таблица 1

Изменение содержания гликогена в мозговой ткани при перегревании

Серии исследований	Число опытов	Гликоген в мг%		
		общий	связанный	свободный
Контрольная группа крыс	12	100	60	40
Крысы, декапит. в сост. тепл. удара тотчас после взятия из тепловой камеры	12	105	56	49
Крысы, декапит. перед гибелью	11	106	66	40



вались замораживанием в жидком кислороде. Определение амидных групп белков проводилось отдельно в коре больших полушарий, среднем и промежуточном мозге (суммарно) и в продолговатом мозге.

Опыты показали, что содержание гликогена в мозговой ткани крыс в процессе перегревания заметно не изменяется. Об этом свидетельствуют данные, представленные в таблице 1.

Для сравнения следует указать, что содержание гликогена в печени, сердечной и скелетной мышцах в этих же условиях резко уменьшается.

В таблице 2 представлены данные об изменении содержания НФ, КФ и АТФ в мозговой ткани.

Таблица 2

Изменение содержания АТФ, КФ и НФ в мозговой ткани при перегревании

Серии исследований	АТФ		КФ		НФ	
	Число опыт.	М $\pm$ м в мгР/г ткани	Число опыт.	М $\pm$ м в мгР/г ткани	Число опыт.	М $\pm$ м в мгР/г ткани
Контрольная группа крыс	9	0,050 $\pm$ 0,008	10	0,047 $\pm$ 0,003	9	0,329 $\pm$ 0,019
Крысы, декапитированные в состоянии возбуждения	8	0,047 $\pm$ 0,007	8	0,094 $\pm$ 0,013	8	0,339 $\pm$ 0,023
Крысы, декапитированные в состоянии теплового удара тотчас после взятия из тепловой камеры	11	0,039 $\pm$ 0,006	7	0,042 $\pm$ 0,001	11	0,368 $\pm$ 0,025
Крысы, декапитированные непосредственно перед гибелью	13	0,045 $\pm$ 0,006	7	0,046 $\pm$ 0,004	10	0,361 $\pm$ 0,020
Крысы, декапитированные через 2 часа после взятия из тепловой камеры	9	0,033 $\pm$ 0,004	9	0,096 $\pm$ 0,017	8	0,387 $\pm$ 0,012

Уровень АТФ в процессе нагревания почти не изменяется. У крыс, декапитированных через 2 часа после взятия из тепловой камеры, наблюдалось небольшое снижение уровня АТФ. Однако отмеченные колебания статистически не достоверны.

Содержание креатинфосфата в мозговой ткани изменялось несколько своеобразно. При небольшом нагревании, когда крысы находились в состоянии легкого возбуждения, отмечалось за-

метное увеличение содержания КФ. Если крысы декапитировались в состоянии теплового удара, уровень КФ был несколько ниже по сравнению с контролем и достоверно ниже по сравнению со второй серией исследований. У крыс, декапитированных через 2 часа после взятия из тепловой камеры, содержание КФ вновь повышалось.

Содержание неорганического фосфора в процессе нагревания постепенно повышалось.

Итак, полученные данные показывают, что содержание макроэргических соединений (АТФ и КФ) в мозговой ткани в процессе перегревания заметно не падает. Даже в тех случаях, когда декапитация крыс осуществлялась непосредственно перед гибелью животных, уровень АТФ и КФ был практически таким же, как и у контрольных крыс. Однако если сравнить содержание КФ в мозговой ткани крыс при различной степени перегревания, обнаруживаются заметные и достоверные колебания. Пока трудно еще объяснить причину этого явления. Можно лишь полагать, что в процессе перегревания могут изменяться скорости процессов образования и расщепления креатинфосфата.

Среди представленных данных обращает на себя особое внимание значительное нарастание в процессе перегревания неорганического фосфата. Это явление отмечалось во всех исследованных нами органах и тканях (мозге, печени, сердечной и скелетных мышцах). Увеличение содержания НФ в тканях может быть связано либо с повышенным поступлением его из крови, т. е. с перераспределением его между кровью и тканями, либо с усиленным распадом фосфорсодержащих органических соединений. Наши проверочные данные показали, что первое предположение вряд ли справедливо, т. к. содержание НФ возрастало не только в тканях, но и в крови. Если это так, то увеличение содержания НФ должно быть связано с усилением процессов катаболизма. Предварительные данные одного из нас дают возможность полагать, что это явление следует объяснять повышенным распадом сложных фосфорсодержащих соединений из фракции кислотонерастворимого фосфора.

В таблице 3 представлено изменение содержания аммиака и глютамина в мозговой ткани. В состоянии теплового удара уровень аммиака в мозговой ткани оказывался резко повышенным. Так, если у контрольных животных уровень аммиака в мозгу составлял 0,25 мг%, то при тепловом ударе — 0,50 мг%. После нагревания, при ухудшении состояния животных, содержание аммиака в мозговой ткани еще более повышалось. Если же состояние животных улучшалось, уровень аммиака в мозгу падал.

Концентрация глютамина в мозговой ткани в момент взятия животных из тепловой камеры несколько снижалась, но затем, уже вне камеры, уровень глютамина повышался.

Таблица 3

## Изменение содержания аммиака и глутамина в мозговой ткани при перегревании

Серии исследований	Аммиак		Амидный азот глутамина	
	Число опыт.	$M \pm m$ в мг%	Число опыт.	$M \pm m$ в мг%
Контрольная группа крыс	9	$0,25 \pm 0,01$	10	$5,40 \pm 0,36$
Крысы, декапит. в состоянии теплового удара тотчас после взятия из камеры	10	$0,50 \pm 0,04$	7	$4,25 \pm 0,30$
Крысы, декапитированные непосредственно перед гибелью	9	$0,54 \pm 0,03$	10	$5,70 \pm 0,41$

Эти данные показывают, что если в процессе нагревания увеличение концентрации аммиака в мозговой ткани сопровождается некоторым снижением уровня глутамина и нарушением глутаминообразования или повышением его распада (чем можно как-то объяснить повышение уровня аммиака), то уже после взятия животных из тепловой камеры, при ухудшении их состояния, увеличение концентрации аммиака наблюдается одновре-

Таблица 4

## Изменение содержания амидного азота белков различных отделов головного мозга при перегревании (в мг/г сухого белка)

Серии исследований	Кора		Промежуточный и средний мозг		Продолговатый мозг	
	Число опыт.	$M \pm m$	Число опыт.	$M \pm m$	Число опыт.	$M \pm m$
Контрольная группа крыс (I)	18	$5,53 \pm 0,14$	18	$6,02 \pm 0,06$	18	$5,33 \pm 0,1$
Крысы, декапитированные в состоянии возбуждения (II)	16	$5,78 \pm 0,08$	16	$6,01 \pm 0,08$	16	$5,38 \pm 0,08$
Крысы, декапитированные в состоянии теплового удара тотчас после взятия из тепловой камеры (III)	18	$5,90 \pm 0,08$	17	$6,02 \pm 0,12$	16	$5,38 \pm 0,09$
Крысы, декапитированные непосредственно перед гибелью (IV)	18	$5,96 \pm 0,11$	16	$6,15 \pm 0,10$	18	$5,47 \pm 0,10$



менно с повышением уровня глутамина. В этом случае источником аммиака служат какие-то другие азотсодержащие вещества.

В таблице 4 представлено изменение общего амидного азота белков различных отделов головного мозга.

Следует прежде всего указать, что содержание амидного азота белков в среднем и промежуточном мозге оказалось достоверно более высоким, чем в других отделах головного мозга. Наши опыты показали также, что в процессе нагревания амидный азот белков коры головного мозга постепенно увеличивается. Это увеличение к моменту гибели животных становится довольно выраженным и статистически достоверным. Что же касается других отделов головного мозга, то мы не отметили в процессе нагревания почти никаких изменений уровня общего амидного азота белков.

Через 15—60 минут после взятия животных из тепловой камеры, т. е. непосредственно перед их гибелью, амидный азот белков указанных отделов мозга оказывался повышенным, но это повышение не достоверно.

Чтобы уточнить, за счет каких фракций (легкогидролизуемой или прочносвязанной) происходит изменение амидного азота белков мозга, мы провели соответствующую серию наблюдений. Полученные данные представлены в таблице 5. Номера серий исследований, указанные в таблице, соответствуют таблице 4.

Таблица 5

Изменение лабильной и прочносвязанной фракций амидного азота белков различных отделов головного мозга при перегревании (в мг/г сухого белка)

Серии исследований.	Кора		Промежуточный и средний мозг		Продолговатый мозг	
	Легко-гидрол.	Прочно-связан.	Легко-гидрол.	Прочно-связан.	Легко-гидрол.	Прочно-связан.
I	2,52	3,15	2,67	3,44	2,30	2,60
II	2,69	3,17	2,65	3,49	2,48	2,67
III	2,71	3,22	2,80	3,33	2,42	2,82
IV	2,78	3,21	2,90	3,24	2,53	2,80

Опыты показали, что увеличение амидного азота белков коры головного мозга идет в основном за счет легкогидролизуемой фракции. Амидный азот прочносвязанной фракции достоверно не изменяется.

В продолговатом мозге содержание амидного азота имеет определенную тенденцию к повышению за счет обеих фракций. Несколько своеобразно изменяется амидный азот белков проме-

жучного мозга. При постоянстве общего азота, его прочно-связанная фракция уменьшалась, тогда как легкогидролизуемая — увеличивалась. Изменение разницы между легкогидролизуемой и прочносвязанной фракциями статистически достоверно. Такое перераспределение амидного азота между указанными фракциями при постоянстве общего амидного азота, по мнению ряда исследователей (6), свидетельствует о структурной перестройке белковых молекул. Если это так, то мы должны сделать вывод, что перегревание приводит к изменению молекулярной структуры белков среднего и промежуточного мозга.

Таким образом, наши данные показывают, что перегревание организма приводит к изменению ряда биохимических показателей в мозговой ткани. Особо обращают на себя внимание нарушения азотистого обмена, выражавшиеся в резком повышении концентрации аммиака, повышении уровня глутамина и изменении амидного азота белков мозга. Мы продолжим наши исследования в направлении раскрытия механизмов этих нарушений. Однако уже сейчас следует отметить следующее. Увеличение концентрации аммиака в мозговой ткани в состоянии теплового удара (после взятия животных из тепловой камеры) наблюдалось одновременно с повышением уровня глутамина и увеличением содержания амидного азота белков мозга. Это свидетельствует о том, что образование аммиака в мозговой ткани в этот период не может быть связано ни с гидролизом глутамина, ни с гидролизом амидных групп белков. Наши данные показывают также, что белки различных отделов головного мозга по-разному реагируют на одно и то же воздействие. Так, в коре головного мозга наиболее отчетливо проявилась способность белков связывать аммиак. Этот процесс, по-видимому, осуществляется за счет поверхностно расположенных свободных карбоксильных групп; амидный азот легкогидролизуемой фракции при этом заметно повышается. В области среднего и промежуточного мозга выраженного амидирования белков не наблюдалось, однако данные белки претерпевают в условиях перегревания какую-то внутримолекулярную перестройку.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ивашкевич Ф., Докт. дисс., С-Петербург, 1870.
2. Горовой-Шалтан В. А., Сборн. рефер. научн. работ за 1943 г. Военно-мед. акад. Кр. Армии им. С. М. Кирова, Ленинград, стр. 78, 1946.
3. Каттер А. Г., Practice of medicine, 1946, 6, 381.
4. Перельман Э. Л., Известия АН ТССР, серия биол. наук, 3, 52, 1962.
5. Хачатурян С. А., Материалы научн. сессии, посвящ. 40-летию основ. ин-та. Ереван, 47, 1963.
6. Гаевская М. С., Хватова Е. М., Швец Н. А., Украинский биохим. ж., 37, 691, 1965.

## О НАРУШЕНИИ РЯДА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И УТОМЛЕНИИ

Н. Ф. Турова, К. И. Погодаев

Проблемная научно-исследовательская лаборатория биохимии мозга при кафедре психиатрии 1 ММИ им. И. М. Сеченова, кафедра биохимии 2-го МГМИ им. Н. И. Пирогова, Москва

Изучение изменения обменных нарушений в головном мозге при атеросклерозе представляет существенное значение для психиатрической клиники, так как при данном заболевании часты случаи возникновения различного рода психических нарушений. Однако изучить обменные процессы в мозге при данном заболевании с помощью современных клинических биохимических методов исследования не представляется возможным. Поэтому на данном этапе развития биохимической науки и психиатрии существенное значение имеет постановка модельных опытов на животных.

Одной из ведущих концепций генеза атеросклероза является представление, связывающее развитие данного заболевания с нарушением кортико-висцеральной регуляции белково-жирового, особенно холестерина обмена (1). Литературные данные указывают на тесную связь обмена холестерина с состоянием ЦНС (2—5). Различного рода перевозбуждения и перенапряжения головного мозга способствуют развитию атеросклероза, что свидетельствует о необходимости исследования обменных процессов при данных состояниях для выявления специфического метаболического фона, на который могут в свою очередь наслаиваться изменения, вызываемые последующим развитием атеросклеротического процесса.

Учитывая тесную связь проблемы утомления и истощения ЦНС с проблемой сосудистых нарушений, мы и поставили в своей работе задачу выявить метаболические изменения головного мозга при вышеуказанных патологиях.



## Методы исследования.

Работа выполнена на белых крысах и кроликах. Атеросклероз (у кроликов) вызывался с помощью скармливания животным холестерина с овощами в дозе 300 мг/кг веса животного на протяжении 3—6 месяцев. В период забоя у животных были обнаружены явно выраженные атеросклеротические поражения аорты и цирроз печени. У кроликов, кормившихся холестерином 4—6 месяцев, был дополнительно также выявлен атеросклероз сонных и коронарных артерий. Состояния утомления и истощения вызывались с помощью повторных судорожных приступов (см. 6, 7) и путем встряхивания животного во вращающемся барабане. АТФ определялась по методу, описанному ранее (8), окислительное фосфорилирование исследовалось в аппарате Варбурга в атмосфере воздуха на кашицах мозга, при этом НФ определялся по Лопес и Лоури. Определение катехоламинов (КА) проводилось по Манухину (9). Белковые фракции исследовались с помощью электрофореза на агаре. Белки экстрагировались 0,9% раствором хлористого натрия, идентификация и количественный расчет фракций проводились с помощью интегрирующего денситометра.

## Результаты исследований

Исследование некоторых показателей энергетического обмена головного мозга при атеросклерозе и утомлении показало, что при этих состояниях происходит истощение основного аккумулятора биологической энергии — АТФ, последнее, вероятно, связано с нарушением ресинтеза данного макроэрга и повышением его расходования.

Так, при повторных судорожных приступах, являющихся великолепной моделью центрального утомления и истощения, в головном мозге крыс отмечается снижение содержания АТФ при нарастании количества НФ. Если при однократном приступе судорог уровень фосфора АТФ составлял  $4,4 \pm 0,19$  мг%, то при семи повторных приступах содержание его падало до  $1,63 \pm 0,48$  мг% (табл. 1). При еще большем числе повторных приступов обнаруживается почти полное отсутствие ресинтеза макроэргов. Так, при изучении процессов окислительного фосфори-

Таблица 1

Содержание макроэргов и неорганического фосфата в мозге крыс при истощении судорожными приступами (в мг% фосфора)

	1 припадок (15 опытов)			Семь припадков (10 опытов)		
	НФ	АТФ	КФ	НФ	АТФ	КФ
М	11,50	4,40	5,50	18,49	1,63	3,48
М ±	0,66	0,19	0,25	1,08	0,48	0,44
Т	5,80	5,50	2,00	—	—	—

лирования, убыль неорганического фосфата составила в контроле  $9,1 \pm 0,85$  мкг-атомов/100 мг ткани (с  $\alpha$ -катоглутаратом), в то время как в опытной группе, с многократно повторяющимися приступами, связывания неорганического фосфата не отмечалось. При этом статистически достоверной разницы в поглощении кислорода не обнаруживается, хотя в среднем в опытной группе оно становится несколько выше (табл. 2).

Таблица 2

Окислительное фосфорилирование в мозге крыс при утомлении и истощении (с  $\alpha$ -кетоглутаратом)

	Кора			Ствол			Характер опыта
	Р	О	Р/О	Р	О	Р/О	
М	5,9	5,9	0,94	4,1	3,8	1,14	Утомление во вращ. барабане, добавлено АДФ (8 опытов)
Т	0,64	0,62	0,099	0,64	0,45	0,15	
Т	2,93	—	8,3	3,9		6,45	
М	10,3	5,0	2,10	8,0	3,3	2,43	Контроль (9 опытов)
м $\pm$	1,28	0,56	0,11	0,92	0,35	0,14	
М	9,1	4,3	2,50				Контроль, добавлено АТФ (6 опытов)
м $\pm$	0,85	0,20	0,40				
М	0	6,1	0				Истощение судорогами (5 опытов)
м $\pm$		1,29					
Т		1,80					

При атеросклерозе мы также отмечаем снижение процессов окислительного ресинтеза макроэргов при падении содержания АТФ в мозге.

На рис. 1 приведены данные, касающиеся содержания АТФ в различных отделах мозга кроликов как контрольных, так и опытных (больных атеросклерозом). Можно видеть, что уровень АТФ у больных кроликов значительно ниже такового у контрольных. Исключение составляет продолговатый мозг, где изменения в содержании АТФ не обнаружено.

В таблице 3 представлены средние данные определения процессов окислительного фосфорилирования в полушариях мозга кроликов с  $\alpha$ -кетоглутаратом при атеросклерозе. Можно видеть, что при данной патологии статистически достоверных изменений в наших условиях опыта в поглощении кислорода кашицами мозга не обнаружено, тогда как связывание НФ было значительно

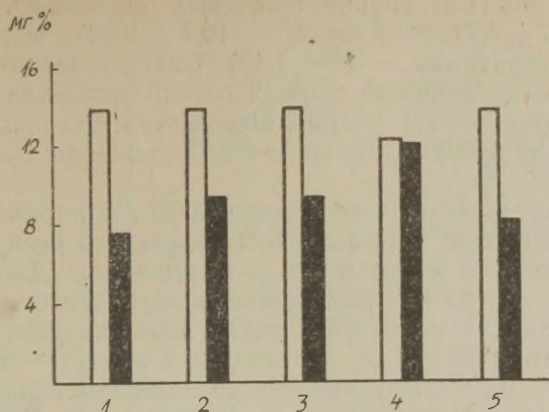


Рис. 1. Содержание аденозинтрифосфорной кислоты в мозге кроликов при атеросклерозе в мг%.

А — контроль, Б — опыт. 1 — полушарие (кора, базальные ганглии, белое вещество), 2 — промежуточный мозг, 3 — средний мозг, 4 — продолговатый мозг, 5 — мозжечок.

Таблица 3

Окисление и фосфорилирование в мозге кроликов при атеросклерозе

	Контроль			Атеросклероз			Субстрат
	Р	О	Р/О	Р	О	Р/О	
М м ± Т	5,4 0,96 1,06	2,90 0,57 2,27	2,05 0,27 3,27	2,9 0,47 —	3,8 0,65 —	0,87 0,18 —	α-кетоглутарат, полушарие
М м ± Т	16,7 2,00 1,4	7,6 1,05 —	2,18 0,155 2,18	9,6 4,71 —	7,8 0,938 —	1,22 0,4 —	Сукцинат, полушарие
М м ± Т	18,0 1,43 3,12	6,3 0,65 —	2,78 0,49 2,20	10,2 2,20 —	7,3 0,66 —	1,50 0,29 —	Сукцинат, ствол

снижено. Так, если в контроле связалось  $5,4 \pm 0,96$  мкг-атомов фосфора, то в опыте — всего лишь  $2,9 \pm 0,47$  мкг-атомов. Отношение Р/О при этом падало с  $2,05 \pm 0,27$  до  $0,87 \pm 0,18$ . Полученные данные свидетельствуют о значительном снижении ресинтеза АТФ при атеросклерозе.

Причем отмечено нарушение синтеза АТФ не только с α-кетоглутаратом, но и с сукцинатом. Так, связывание НФ с сук-



динатом в опытной группе животных снижалось в полушариях до  $9,6 \pm 4,71$  (контроль —  $16,7 \pm 2,00$ ), в стволе — до  $10,2 \pm 2,20$  (контроль —  $18 \pm 1,43$ ). Статистически достоверных сдвигов в потреблении кислорода не наблюдалось (контроль —  $6,3 \pm 0,65$ , опыт —  $7,3 \pm 0,66$ ). Отношение Р/О падало с  $2,78 \pm 0,49$  до  $1,50 \pm 0,29$  в стволе и с  $2,18 \pm 0,15$  до  $1,22 \pm 0,4$  в полушариях.

Утомление животных во вращающемся барабане также приводило к снижению процессов окислительного ресинтеза макроэргов в стволовой части мозга и полушариях. Данные отображены в табл. 2, из которой можно видеть, что фосфорилирование в полушариях мозга утомленных крыс снижалось до  $5,90 \pm 0,64$  вместо  $10,30 \pm 1,28$  мкг-атомов; в стволе — до  $4,10 \pm 0,64$  вместо  $8,00 \pm 0,92$ . Статистически достоверных отличий в поглощении кислорода не отмечалось. Коэффициент Р/О в полушариях и стволовой части падал соответственно до  $0,940 \pm 0,099$  и  $1,114 \pm 0,150$  вместо  $2,100 \pm 0,114$  и  $2,43 \pm 0,14$  в контроле.

Мы видим, что различного рода состояния перенапряжения приводят к снижению ресинтеза АТФ. Синтез АТФ снижен и при атеросклерозе. Естественно, что наложение на атеросклеротический фон добавочных и истощающих факторов в виде различного рода напряжений может довести энергетические резервы мозга до крайнего истощения. Немудрено, что в условиях психогенно-травмирующей ситуации и других неблагоприятных воздействий у лиц с сосудистыми заболеваниями мозга наиболее легко возникают реактивные состояния и состояния декомпенсации (10).

Почти все процессы жизнедеятельности идут с использованием химической энергии, заключенной в макроэргических фосфорных связях АТФ. Поэтому нарушение ресинтеза последней, приводящее к падению ее содержания, не может не сказаться на нормальном ходе обменных процессов головного мозга. Тем более, что в живом организме метаболические процессы взаимосвязаны и взаимообусловлены, и нарушение одного звена общей цепи обменных процессов не может не отразиться на других её звеньях.

И действительно, при атеросклерозе мы сталкиваемся с изменением некоторых показателей белкового и медиаторного — гормонального обмена.

Так, при атеросклерозе в полушариях головного мозга нами отмечены значительные изменения белковых фракций. Наблюдается снижение содержания легко и менее подвижных в электрическом поле альбуминовых, преальбуминовых и  $\gamma_1$ -,  $\gamma_3$ -глобулиновых фракций белков головного мозга, одновременно увеличиваются средние по подвижности  $\alpha_2$ - и  $\beta_1$ -глобулины (табл. 4).

Все это свидетельствует о структурной перестройке белковой молекулы. Ведь в понятие отдельной фракции входит группа

Таблица 4

Электрофоретические фракции белков головного мозга кроликов  
при атеросклерозе

	Преаль- бумины	Альбу- мины	Глобулины							
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma_1$	$\gamma_2$	$\gamma_3$	
М	9	13	9	10	21	10	16	6	6	Контроль
м ±	0,60	1,00	1,26	0,57	1,35	0,79	2,11	0,95	0,63	
Т	3,75	3,70	0,5	4,44	2,25	1,85	2,31	—	3,33	
М	6	6	10	14	29	15	10	6	3	Опыт
м ±	0,62	1,57	1,24	0,66	3,32	2,62	1,58	1,73	0,32	

белков, близких по своим физическим и химическим свойствам. И если каждую из полученных фракций подвергнуть дальнейшей обработке, то, по всей вероятности, можно выделить из неё несколько подфракций с различными свойствами. В настоящее время из серого вещества мозга удалось выделить до ста различных белков (11). Изменения вторичной и третичной структуры белков — комплексообразование и распад комплексов, а также раскручивание белковой глобулы и обратное явление — могут вызвать трансформацию одной фракции в другую. Так, предполагается, что если в комплексе принимают участие белки, похожие на альбумины или  $\gamma$ -глобулины, то они могут обнаруживаться во фракциях  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов. Работы лаборатории Троицкого и ряда других исследователей показали возможность трансформации альбуминов в  $\alpha$ -глобулин и т. п. (12). Исследования, проведенные рядом авторов (13—14), также подтверждают возможность перехода одной фракции в другую в результате структурных изменений белка. Итак, различные структурные изменения могут приводить и к сдвигам в количественном соотношении белковых фракций (диспротеинемиям). На основании вышесказанного можно полагать, что при атеросклерозе белки головного мозга претерпевают ряд конформационных превращений, что приводит к изменению их свойств и вызывает, естественно, нарушение нормального хода обменных процессов.

При атеросклерозе нами также отмечено снижение содержания в полушариях головного мозга и промежуточном мозге норадреналина (НА) при увеличении адреналина (А) и неизменном уровне общего числа КА (табл. 5). Причем подобные сдвиги обнаружены нами при глубокозашедших стадиях атеросклероза, тогда как при более ранних формах его проявления наиболее существенные изменения отмечались в нижележащих отделах головного мозга, в частности в среднем мозге. Сдвиги, аналогичные последним, были нами отмечены и при 4 повторных судорожных приступах, приводящих к достоверному снижению содержания НА и увеличению количества А, при снижении общего уровня КА в среднем мозге. При 3-месячной нагрузке холестерином также отмечается падение общего уровня КА в среднем и промежуточном мозге за счет снижения содержания НА.

Таким образом, и при припадках, приводящих к утомлению, и при ранних формах атеросклероза отмечаются однонаправленные сдвиги в КА среднего мозга, что позволяет провести некоторую параллель между этими двумя, казалось бы столь разными патологиями.

Одной из гипотез возникновения психических нарушений является концепция Хоффера (15), связывающая последние с извращением обмена А, с переключением его превращений на хиноидный путь, в результате которого возможно появление мощных галлюциногенов — адренохрома и адренолютина. И дей-



Катехоламины мозга при атеросклерозе и утомления (в мкг/грамм влажного веса)

	Полушария			Промежуточный мозг			Средний мозг			Характер опыта
	НА	А	КА	НА	А	КА	НА	А	КА	
$M_{\pm}$	0,27 0,042	0,07 0,01	0,34 0,04	0,54 0,09	0,10 0,06	0,64 0,06	0,70 0,10	0,04 0,02	0,73 0,09	Контроль (7 опытов)
$M_{\pm}$ Т	0,27 0,06	0,08 0,024	0,34 0,04	0,75 0,08 1,76	0	0,81 0,08 1,65	0,13 0,09 4,37	0,40 0,09 3,83	0,53 0,04 1,95	4 электросудорожных приступа (7 опытов)
$M_{\pm}$ Т	0,23 0,05	0,04 0,02	0,27 0,03	0,44 0,11	0,07 0,03	0,51 0,09	0,25 0,11 3,21	0,17 0,07 1,3	0,42 0,08 2,58	Атеросклероз аорты (2,5—3,0 м-ца нагруз- ки холестерином) (6 опытов)
$M_{\pm}$ Т	0,08 0,03 1,74	0,07 0,12	0,14 0,02 0,09	0,36 0,08 1,3	0,10 0,03	0,46 0,08 1,17	0,36 0,08	0,09 0,02	0,45 0,08 1,00	Атеросклероз аорты, сонных и коронар- ных артерий (4—6 м-ев нагрузки холе- стерином) (12 опытов)
$M_{\pm}$	0,14 0,03	0	0,17 0,03	0,54 0,12	0	0,60 0,09	0,50 0,07	0,07 0,02	0,57 0,09	Контроль (10 опытов)

ствительно, если в головном мозге превращения А происходят по хиноидному пути (см. 16), то надо полагать, что большое количество А может приводить и к повышенному накоплению продуктов его превращения, что может служить одним из факторов возникновения психических нарушений при глубоко зашедших формах атеросклероза.

Таким образом, при атеросклерозе мы отмечаем значительные сдвиги энергетического обмена, изменения белков головного мозга, а также качественные сдвиги КА, выражающиеся в снижении содержания НА и повышении А. Причем эти изменения носят фазовый характер. На более ранних стадиях отмечены изменения лишь в среднем мозге, на более поздних этапах отмечается нарушение этих показателей в полушариях и промежуточном мозге. Изменения содержания КА на ранних этапах развития атеросклероза (2,5—3,0 месяца нагрузки холестерином) аналогичны таковым при состояниях утомления, вызванных судорожными приступами. Еще более выраженное сходство по биохимическим показателям этих двух патологических состояний мы наблюдаем в отношении энергетического обмена. Мозг животных, с более или менее пораженными сосудами, характеризуется соответствующими более или менее пониженными энергетическими ресурсами, близкими к тем, которые наблюдаются в мозгу животных, истощенных или только утомленных двигательным перенапряжением.

Отмечаемый нами параллелизм в изменениях показателей энергетического и медиаторно-гормонального обмена мозга при утомлении и атеросклерозе согласуется с данными клинико-биохимических исследований, которые с давних времен подчеркивали нарушения в указанных видах обмена при различных психических расстройствах. Утомление или истощение ЦНС также весьма характерно для психических заболеваний.

## Выводы

1. При экспериментальном атеросклерозе и различного рода функциональных перенапряжениях (истощение судорожными приступами, встряхивание животных во вращающемся барабане) в головном мозге отмечается снижение ресинтеза АТФ, а также падение ее содержания (атеросклероз и истощение судорогами), что свидетельствует об истощении функционального потенциала мозга при данных состояниях.

2. При атеросклерозе аорты, коронарных и сонных артерий отмечается снижение преальбуминовых, альбуминовых и  $\gamma_1$ ,  $\gamma_3$ -глобулиновых фракций белков полушарий мозга, одновременно увеличиваются средние по подвижности  $\alpha_2$ - и  $\beta_1$ -глобулины, что связывается со структурной перестройкой белковых молекул.

3. При ранних формах атеросклероза и утомлении судорожными приступами в среднем мозге отмечается снижение содержания НА и увеличение количества А.

4. При далеко зашедших формах атеросклероза изменений в КА среднего мозга не отмечается, в полушариях же и промежуточном мозге наблюдается снижение содержания НА при увеличении А и неизменном уровне суммы данных веществ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мясников А. Л., Атеросклероз, 1960.
2. Lyons E., Am. J. Physiol., **98**, 156—162, 1931.
3. Katz H. L., Nice L. B., Am. J. Physiol., **107**, 709—716, 1934.
4. Friedman M., Roseman R., Carol V., Circulation, **5**, 852—861, 1958.
5. Peterson I., Keith R., Wilcox A., Circulation, **25**, 5, 748—803, 1962.
6. Погодаев К. И., Турова Н. Ф., Ховах И. М., Андрианова А. Г., В сб. Вопросы клинической психиатрии. Тр. 1-ого МОЛМИ, **34**, 1964.
7. Погодаев К. И., В сб. Патохимия мозга. Тр. 1-ого МОЛМИ, **26**, 1963.
8. Мешкова Н. П., Северин С. Е., Практикум по биохимии животных, 1950.
9. Манухин Б. Н., Биохимия, **26**, вып. 4, 1961.
10. Гордова Т. Н., В сб. Проблемы невропатологии, М., 297, 1963.
11. Bogoch S., Rajam P., Belval P., Nature, **204**, 4953, 73—75, 1964.
12. Троицкий Г. В., Электрофорез белков. Изд. ХГУ, 1962.
13. Segal L., Acta biol. et med. german., **10**, 5—6, 48.
14. Mildenhauer H., Biol. Rundschau, **2**, 1, 43, 1964.
15. Хоффер А., В сб. Биохимия психозов. ИЛ, 1963, М.
16. Утевский А. М., Осинская В. О., Калиман П. А., Укр. биохим. ж., **37**, 5, 1965.



## ОБМЕН АММИАКА, СТЕПЕНЬ АМИДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АММИАКА, ТИАМИНА И ПИРИДОКСИНА

Д. А. Энно

Кафедра биохимии и Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета, Тарту

Несмотря на многосторонние исследования, направленные на выяснение роли витаминов как составных частей многих коферментов в обменных процессах в животном организме, вопрос о влиянии витаминов на метаболизм мозга остается еще недостаточно разработанным. В то же время известно, что при многих авитаминозных состояниях, в частности при цынге, бери-бери, пеллагре, и др., наступают серьезные расстройства в деятельности ЦНС (1, 2). Поэтому для выяснения биохимических механизмов влияния витаминов на те или иные конкретные звенья обмена веществ в нервной ткани необходимы дальнейшие исследования.

В предыдущих наших работах (3) в этом плане исследовалось влияние витамина С на процессы образования и связывания аммиака в ткани мозга. Оказалось, что при С-авитаминозе эти процессы глубоко нарушены: ослабляется связывание аммиака как в форме глутаминовой кислоты, так и белками мозга, в опытах *in vivo* витамин С оказывает отчетливое стимулирующее влияние на обезвреживание в мозгу этого токсического метаболита.

В продолжение этих исследований в настоящем сообщении нами исследовалось влияние витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>6</sub> на обмен аммиака, глутамина и амидных групп белков в мозгу, а также на активность глутаминазы и АТФазы в гомогенатах, приготовленных из больших полушарий головного мозга.

Опыты ставились на белых крысах весом 150—200 г. В первой серии опытов тиамин вводился крысам в виде 5% раствора в количестве 200—300 мг на кг веса и через 15 минут хлористый аммоний в виде 10% раствора из расчета 0,3—0,5 г на кг веса. Другим животным вводился только хлористый аммоний.

Параллельно были исследованы контрольные животные без введения тиамин и хлористого аммония.

Во второй серии крысам вводилось подкожно большое количество тиамин (0,8—1,0 г на кг веса). Исследования на этих животных были проведены через 15—20 минут, когда у них развивались возбужденное состояние и судороги.

В третьей серии опытов одни крысы служили контролем, другим вводился хлористый аммоний в дозе 0,3—0,5 г/кг и третьим за 15 минут до введения хлористого аммония вводился витамин В<sub>6</sub> в количестве 150 мг на кг веса.

Животные умерщвлялись путем погружения их целиком в жидкий азот. Из растертого замороженного мозга брались пробы для определения аммиака, глутамин и амидных групп белков ранее описанными методами (4). Для определения сульфгидрильных групп приготавливали из мозгового порошка экстракт, содержащий 16—18 мг растворимых в физиологическом растворе белков в 1 мл (5). В экстракте определяли количество белков по Лоури и др. (Lowry et al., 6) и количество сульфгидрильных групп спектрофотометрическим методом с р-хлормеркурибензоатом по Х. М. Рубин и Л. А. Романчуку (7). Синтез р-хлормеркурибензоата производился по А. Н. Несмеянову и Л. Г. Макаровой (8).

Активность глутаминазы определяли в следующей инкубационной смеси: глутамин 0,1 М — 0,5 мл; 0,05 М трис-НCl буфер — 2,5 мл; NaCl 0,9% — 1 мл и 0,5 мл 5% гомогената в физиологическом растворе.

Каждую пробу инкубировали с 0,5 мл 5 М фосфатом или без фосфата при температуре 37°, pH 8,0, в водяном термостате. Активность глутаминазы определяли по приросту в инкубационной смеси аммиака методом Селигсона (10).

Активность тотальной АТФ-азы определяли в 1,5 мл реакционной смеси, которая содержала 30 мМ трис-НCl, pH 7,4; 3 мМ АТФ, нейтрализованного трис буфером, 100 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ KCl в конечной концентрации и 0,7 мл 0,7% гомогената в 0,25 М сахарозе.

Mg<sup>2+</sup>-активируемую АТФ-азу определяли в той же реакционной смеси без Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Разница между активностью тотальной АТФ-азы и Mg<sup>2+</sup>-активируемой АТФ-азы выражает активность Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> активируемой АТФ-азы. Контрольная проба не содержала ионов Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Пробы инкубировали 10 мин. при температуре 37°C. Реакция останавливалась прибавлением 0,5 мл 20% CCl<sub>3</sub>COOH. После центрифугирования определяли в центрифугате неорганический фосфор по методике Суббароу в модификации Мартинсона и Виллако (11). Количество белков определяли по Лоури и др. (6).

## Полученные результаты и их обсуждение

Оказалось, что введение крысам только хлористого аммония приводит к отчетливому увеличению количества свободного аммиака в мозгу по сравнению с контрольными животными. Предварительное введение тиамин не оказывает влияния на количество аммиака. Но при этом происходит усиленное связывание аммиака в форме глутамин, количество которого статистически достоверно увеличивается (рис. 1).

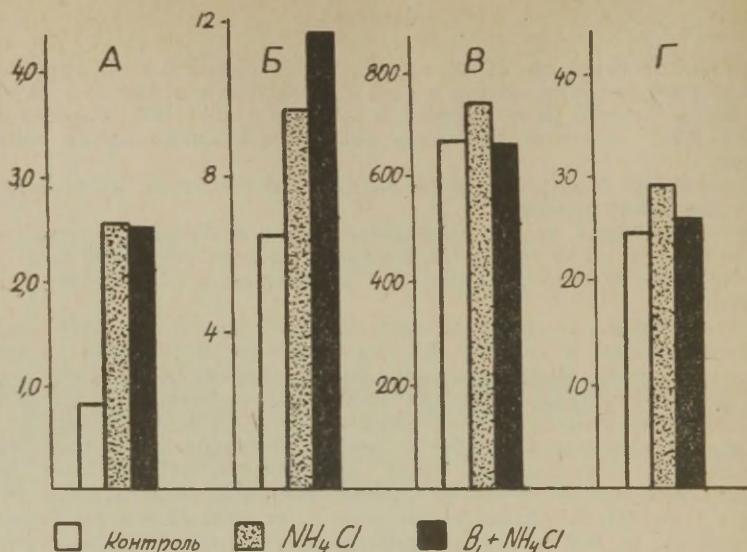


Рис. 1. Количество аммиака, амидного азота, глутамина, амидного азота белков и сульфгидрильных групп белков мозга после введения тиамин и аммиака.

А. — количество аммиака (в мг % азота аммиака) в мозге. Б. — количество глутамин (в мг % амидного азота глутамин) в мозге. В. — количество амидного азота белков (в мкг на 1 г сырой ткани) в мозге. Г. — количество сульфгидрильных групп белков (в мг на 1 г растворимого белка) в мозге.

Следовательно, тиамин, как и витамин С в наших предыдущих работах, усиливает синтез глутамин в мозгу. Это находит свое подтверждение в таком же стимулирующем влиянии тиамин на синтез глутамин в мышцах в опытах Д. Л. Фердмана (12).

Определение степени амидирования белков мозга выявило, что при введении одного хлористого аммония происходит связывание аммиака белками мозга, в результате чего количество амидных групп белков мозга увеличивается. Это находится в соответствии с данными наших предыдущих работ (4). Однако предварительное введение тиамин не способствует процессу амидирования, а наоборот, связывание аммиака белками мозга в этом случае по сравнению с введением одного хлористого аммония даже ослабляется (рис. 1).

В количестве свободных сульфгидрильных групп в этой серии опытов не удалось установить закономерных изменений, хотя в опытах с введением одного хлористого аммония отмечается общая тенденция к их увеличению, которая оказалась статистически не достоверной. Таким образом, в этих опытах на фоне



экспериментального накопления аммиака в мозгу тиамин нарушает связывание аммиака белками мозга, но стимулирует синтез глутамина, в результате чего уровень свободного аммиака в мозгу не изменяется.

Во второй серии опытов, когда крысам вводились подкожно большие количества одного тиамин (0,8—1,0 г на кг веса), биохимические исследования установили, что в этот период у животных происходит в мозгу заметное статистически достоверное увеличение количества свободного аммиака (рис. 2). Однако

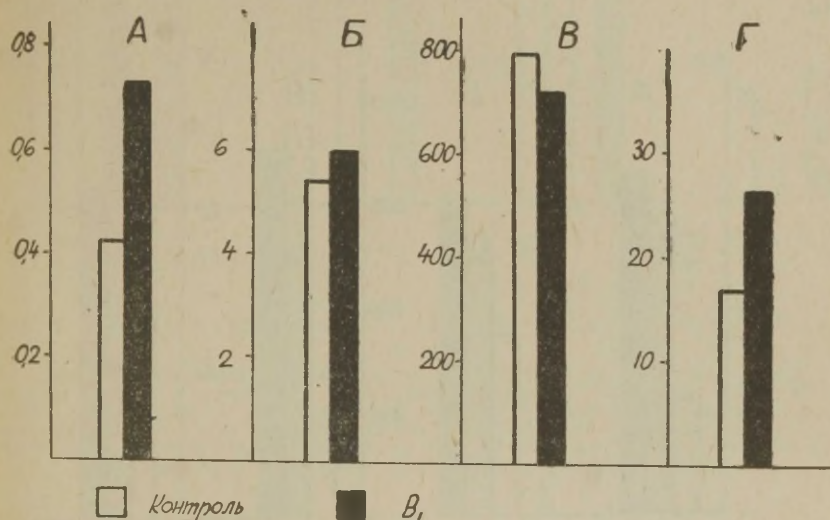


Рис. 2. Количество аммиака, амидного азота глутамина, амидного азота белков и сульфгидрильных групп белков в мозгу после введения больших доз тиамин.

Обозначения см. к рис. 1.

при этом освобождение аммиака происходит не за счет расщепления глутамин, количество которого не изменяется, а даже несколько увеличивается. Это является подтверждением данных первой серии опытов о стимулирующем влиянии тиамин на синтез глутамин. Определение амидных групп белков выявило, что в этих условиях источником аммиака являются белки, количество амидных групп которых отчетливо уменьшается. Такие же изменения были нами ранее обнаружены при возбуждении центральной нервной системы электрическим током и при инсулиновой гипогликемии (13, 14).

Следовательно, биохимический механизм возбуждения при больших дозах тиамин по обмену аммиака не отличается от других видов возбуждения. При этом происходит увеличение

также других активных групп белков, в частности, сульфгидрильных (рис. 2). По представлениям Унгара такое изменение является характерным также для возбужденного состояния (15).

В третьей серии, когда крысам вводился витамин В<sub>6</sub>, биохимический анализ мозга установил, что влияние витамина В<sub>6</sub> на процессы связывания аммиака в нервной ткани совпадает с влиянием тиамин (рис. 3). И витамин В<sub>6</sub> стимулирует связывание аммиака глютаминовой кислотой в глютамин и задерживает амидирование белков мозга. В количестве сульфгидрильных групп не было обнаружено статистически достоверных изменений.

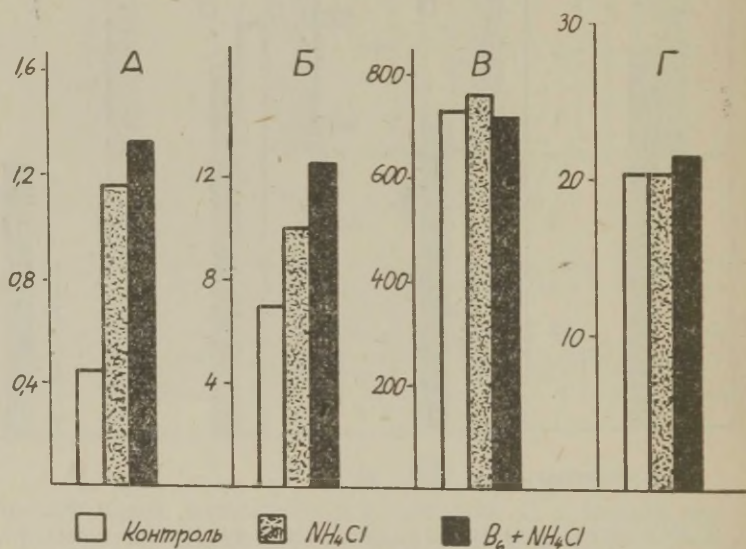


Рис. 3. Количество аммиака, амидного азота глутамина, амидного азота белков и сульфгидрильных групп белков мозга после введения витамина В<sub>6</sub> и аммиака.

Обозначения см. к рис. 1.

Таким образом, эти данные свидетельствуют об активном влиянии как витамина В<sub>1</sub>, так и витамина В<sub>6</sub> на обмен аммиака в нервной ткани. В обоих случаях это влияние осуществляется через стимуляцию синтеза глутамина. В то же время эти витамины оказывают ингибирующее действие на участие белков в процессе устранения аммиака. Для объяснения и расшифровки найденных изменений, в частности под действием витамина В<sub>1</sub>, в гомогенатах мозга была определена активность ферментов, участвующих в обмене глутамина, а также АТФазы (рис. 4).

Оказалось, что при экспериментальном накоплении аммиака в гомогенатах мозга происходит незначительное уменьшение

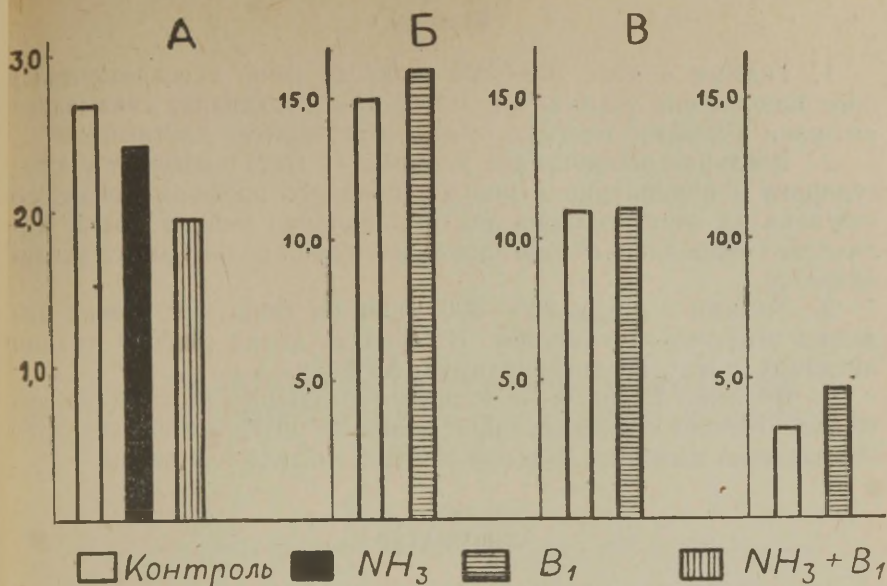


Рис. 4. Активность глутаминазы и АТФ-азы после введения тиаминa и аммиака.

А — активность глутаминазы (в мкМ азота аммиака на 1 мг белка за 30 мин.) после введения тиаминa и аммиака. Б — активность тотальной АТФ-азы (в мкМ неорганического Р на 1 мг белка за 60 мин.) после введения больших доз тиаминa. В — активность  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азы (в мкМ неорганического Р на 1 мг белка за 60 мин.) после введения больших доз тиаминa. Г — активность  $(\text{Na}^+ \text{K}^+)\text{-АТФ-азы}$  (в мкМ неорганического Р на 1 мг белка за 60 мин.) после введения больших доз тиаминa.

активности глутаминазы. Совместное введение хлористого аммония и тиаминa приводит к более заметному угнетению глутаминазы. Введение больших доз одного тиаминa не вызывает изменения в активности глутаминсинтетазы. Таким образом, в основе стимулирования тиамином синтеза глутаминa лежит, очевидно, его ингибирующее влияние на глутаминазы. В последнее время установлено (18), что при недостатке витамина  $\text{B}_1$  происходят глубокие нарушения в белковом обмене, в частности в увеличении катаболизма белков. Возможно, что найденное нами влияние витамина  $\text{B}_1$  на ферменты обмена аммиака составляют одно из этих звеньев влияния тиаминa на азотистый обмен.

В активности тотальной и  $\text{Mg}^{2+}$ -активируемой АТФазы не было найдено заметных изменений.

Найденное нами увеличение активности  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -активируемой АТФазы под действием тиаминa находится в соответствии с литературными данными о влиянии тиаминa на транспорт натрия (16, 17) и о роли его в возникновении мембранного потенциала.



## Выводы

1. Тиамин в дозе 200—300 мг/кг на фоне экспериментального накопления аммиака в мозгу крыс подавляет связывание аммиака белками мозга и стимулирует синтез глутамина.

2. Введение больших доз тиамина (1 г/кг) вызывает у крыс судороги и накопление в мозгу свободного преформированного аммиака за счет усиления дезамидирования белков мозга. Количество свободных сульфгидрильных групп белков мозга увеличивается.

3. Тиамин в дозах 200—300 мг/кг на фоне накопления аммиака угнетает глутаминазу. В больших дозах (1 г/кг) тиамин активирует  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активируемую АТФазу.

4. Витамин  $\text{B}_6$  на фоне экспериментального накопления аммиака угнетает его связывание белками мозга, но способствует связыванию аммиака путем усиления синтеза глутамина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рысс С. М., В кн.: Витамины. Медгиз., М., 1955.
2. Zbinden G., Annals of the New York Academy of Sciences 98, 550, 1962.
3. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Энно Д. А., Уч. зап. ТГУ, 143, 273, 1963.
4. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Биохимия, 21, 984, 1961.
5. Палладин А. В., Полякова Н. М., ДАН СССР 107, 568, 1956.
6. Lowry O. H., Rosenbrough W. J., Farr A. L., Randall R. J., Biol. Chem. 193, 265, 1951.
7. Рубина Х. М., Романчук Л. А., Вопросы мед. химии, 7, 652, 1961.
8. Несмеянов А. Н., Макарова Л. Г., Ж. общей химии, 1, 598, 1931.
9. Hestrin S., J. Biol. Chem 180, № 1, 249, 1949.
10. Seligson D., Seligson H., J. Lab. Med. 38, 324, 1951.
11. Мартинсон Э. Э., Виллако Л. Х., Лаборат. дело, № 2, 30—32, 1961.
12. Фердман Д. Л., Эпштейн С. Ф., Бюлл. эксп. биол. мед. 25, 239, 1948.
13. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., III Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы. Ереван, 103, 1963.
14. Тяхепыльд Л. Я., ДАН СССР, 147, 964, 1962.
15. Унгар Дж., В сб.: Проблемы эволюции функций и энзимохимии процессов возбуждения. Изд. АН СССР, М., 343, 1961.
16. Muralt V. A., Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie, S. 181, Springer-Verlag, Heidelberg 1958.
17. Eckert M., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 338, N 3/6 283—286.
18. Спиричев В. Б., В кн.: Молекулярные основы патологии, М., 220, 1966.

## ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ОКИСЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СУБСТРАТОВ В МИТОХОНДРИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ МОЗГА

Е. Л. Доведова

Лаборатория биогистохимии Института мозга АМН СССР, Москва

Известно, что окисление различных субстратов в мозгу происходит с неодинаковой интенсивностью, что, по-видимому, определяется как особенностями обмена каждого из субстратов, так и степенью использования его в метаболизме отдельных структурных компонентов мозга (1—3).

Как было установлено нами (4), эта закономерность характерна и для различных образований, входящих в анализаторные системы мозга, отличающиеся по структуре и выполняемой функции. Так, во всех звеньях анализатора при использовании в качестве субстрата окисления янтарной кислоты, интенсивность дыхания выше, а уровень окислительного фосфорилирования и сопряженность этих процессов значительно ниже, чем при использовании глутаминовой кислоты. Было интересно выяснить, проявляется ли «субстратная специфичность», обнаруженная в ткани серого вещества мозга, во фракции митохондрий различных отделов ЦНС.

По данным, полученным в нашей лаборатории (5), митохондрии коры больших полушарий, ствола и белого вещества головного мозга обнаруживают структурные и биохимические особенности. Было показано, что митохондрии этих образований отличаются между собой как по свойствам компонентов дыхательной цепи, так и по свойствам мембран.

В настоящем сообщении приводятся результаты исследования окисления ряда субстратов ( $\alpha$ -кетоглутаровая, пировиноградная, янтарная, глутаминовая,  $\gamma$ -аминомасляная кислоты, глюкоза, НАД-Н<sub>2</sub>) в митохондриях различных отделов мозга кошки.

## Материал и методы

В работе было использовано 10 животных. Исследовали митохондрии, выделенные из коры больших полушарий, из серого вещества столовой части мозга (суммарно ядра промежуточного и среднего мозга) и белого вещества, подстилающего кору больших полушарий. Митохондрии выделяли по методу Фолио и Самоджи (6), несколько модифицированному в нашей лаборатории (7). Чистоту фракций контролировали периодически при помощи электронной микроскопии (рис. 1). В суспензии митохондрий манометрическим методом определяли интенсивность дыхания. Инкубационная смесь (2 мл) состояла из следующих компонентов в конечной концентрации их: 0,05 М КСl; 0,008 М  $MgCl_2$ ; 0,012 М триоксиметиламинометана (трис); 0,025 М фосфатного буфера рН 7,2; 0,01 М NaF; 0,002 М АДФ; 0,05 М глюкозы и раствора гексокиназы (1 мг белка в 1 мл); субстраты дыхания использовали в конечной концентрации 0,010 М. В качестве акцепторов макроэргического фосфата применяли систему глюкоза-гексокиназа. После 20-минутной регистрации поглощения кислорода при 26°C белки в пробах осаждали трихлоруксусной кислотой и в центрифугате определяли убыль неорганического фосфата по методу Эннора и Розенберг (8). Убыль неорганического фосфата в опытной пробе по сравнению с контрольной рассчитывали по стандартной кривой, построенной для определенных навесок  $KN_2PO_4$ .

Результаты исследований выражали в микрограмм-атомах поглощенного кислорода или неорганического фосфата на мг белка за 1 час. Соответственно рассчитывали коэффициент Р/О. Белок митохондрий определяли по методу Лоури и др. (9). Полученные данные были статистически обработаны.

## Результаты исследования

В результате наших опытов показано, что на каждом субстрате окисления уровень дыхания и сопряженного с ним фосфорилирования в митохондриях различных отделов мозга неодинаков. Можно отметить снижение поглощения кислорода, убыли неорганического фосфора и величины Р/О в направлении от коры больших полушарий к серому веществу стволовых образований и белому веществу (табл. 1). Вместе с тем имеются определенные особенности окисления отдельных субстратов в митохондриях исследуемых участков мозга. Так, например, (рис. 2) в митохондриях коры больших полушарий на глутамате наблюдается активное потребление кислорода и фосфорилирование, в митохондриях ствола и белого вещества уровень этих процессов значительно ниже, что приводит к последовательному уменьшению коэффициента Р/О (соответственно 1,69; 1,58; 1,43).

В то же время, при использовании в качестве субстрата окисления  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (рис. 3), в митохондриях коры больших полушарий обнаружено более слабое дыхание, чем на других субстратах, но при этом уровень фосфорилирования и, следовательно, сопряженность этих процессов высоки (Р/О около 3,0). В митохондриях ствола и белого вещества уровень всех исследовавшихся показателей и коэффициент Р/О значительно ниже (Р/О соответственно 1,37 и 1,32).

Наоборот, при использовании сукцината в качестве субстрата



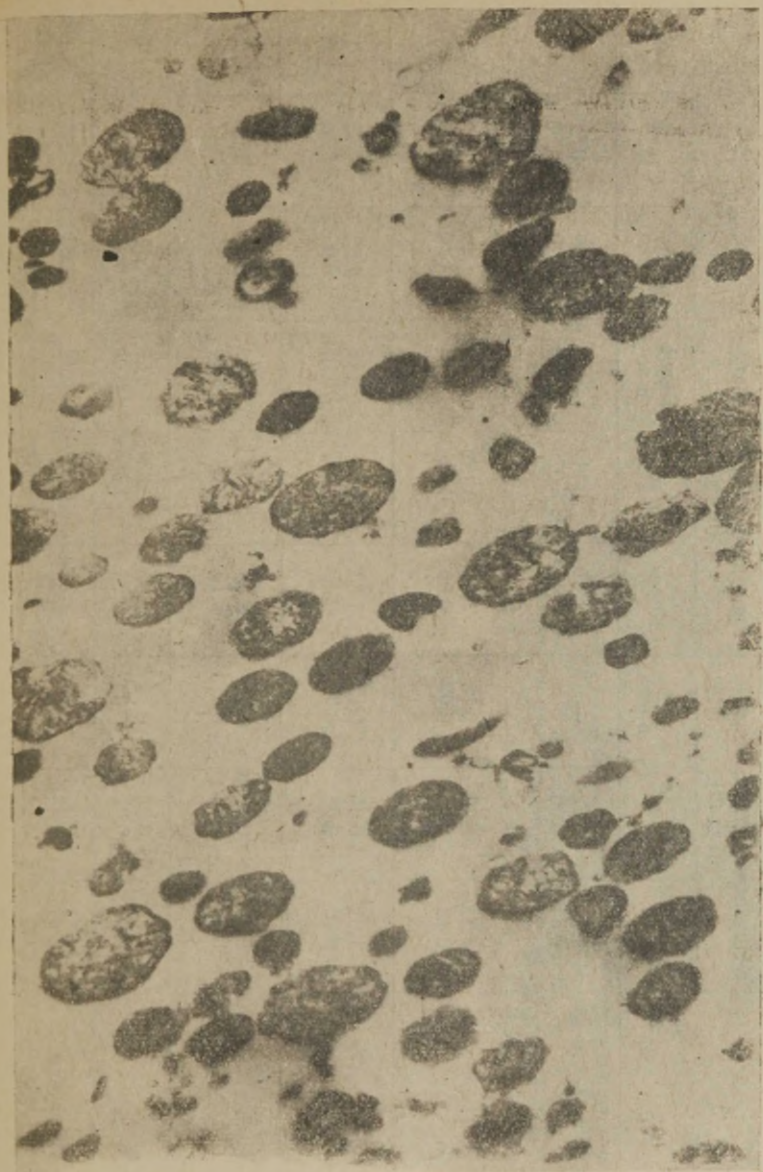


Рис. 1. Фракция митохондрий мозга кошки под электронным микроскопом (ув. 20 000 раз).

## Окислительный обмен ряда субстратов в митохондриях различных отделов мозга кошки

Субстраты	Интенсивность дыхания ( $M \pm m$ )			Уровень фосфорилирования ( $M \pm m$ )			P/O ( $M \pm m$ )		
	Кора	Ствол	Белое в-во	Кора	Ствол	Белое в-во	Кора	Ствол	Белое в-во
НАД-Н <sub>2</sub>	1,73 $\pm 0,54$	0,22 $\pm 0,06$	—	1,71 $\pm 0,47$	0,11 $\pm 0,02$	—	0,99 $\pm 0,20$	0,51 $\pm 0,08$	—
Глюкоза	1,24 $\pm 0,48$	0,13 $\pm 0,03$	0,13 $\pm 0,02$	1,75 $\pm 0,39$	0,130 $\pm 0,03$	0,140 $\pm 0,04$	1,42 $\pm 0,58$	1,00 $\pm 0,28$	1,08 $\pm 0,34$
Пировиноградная кислота	1,01 $\pm 0,30$	0,21 $\pm 0,03$	0,12 $\pm 0,06$	1,83 $\pm 0,35$	0,31 $\pm 0,03$	0,18 $\pm 0,01$	1,82 $\pm 0,60$	1,49 $\pm 0,38$	1,44 $\pm 0,25$
γ-аминомасляная кислота	0,82 $\pm 0,30$	0,17 $\pm 0,03$	0,09 $\pm 0,01$	2,38 $\pm 0,16$	0,24 $\pm 0,08$	0,12 $\pm 0,04$	2,89 $\pm 0,83$	1,37 $\pm 0,47$	1,32 $\pm 0,14$
Янтарная кислота	1,77 $\pm 0,60$	0,23 $\pm 0,04$	0,15 $\pm 0,02$	2,02 $\pm 0,53$	0,33 $\pm 0,08$	0,28 $\pm 0,05$	1,11 $\pm 0,27$	1,45 $\pm 0,04$	1,89 $\pm 0,51$
α-кетоглутаровая кислота	1,51 $\pm 0,64$	0,36 $\pm 0,06$	0,15 $\pm 0,01$	2,74 $\pm 0,28$	0,38 $\pm 0,02$	0,14 $\pm 0,01$	1,82 $\pm 0,17$	1,06 $\pm 0,21$	0,91 $\pm 0,23$
Глутаминовая кислота	1,56 $\pm 0,35$	0,22 $\pm 0,04$	0,16 $\pm 0,02$	2,56 $\pm 0,49$	0,35 $\pm 0,07$	0,22 $\pm 0,04$	1,69 $\pm 0,46$	1,58 $\pm 0,27$	1,43 $\pm 0,31$

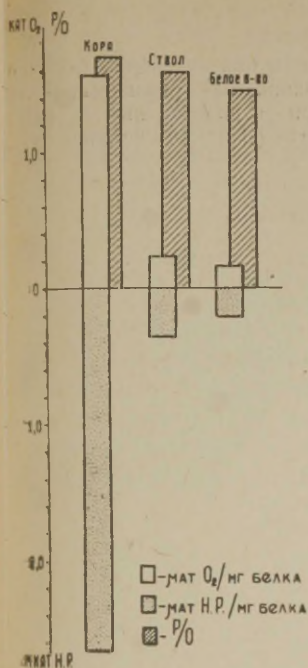


Рис. 2. Дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях различных отделов мозга кошки при использовании в качестве субстрата глутаминовой кислоты.

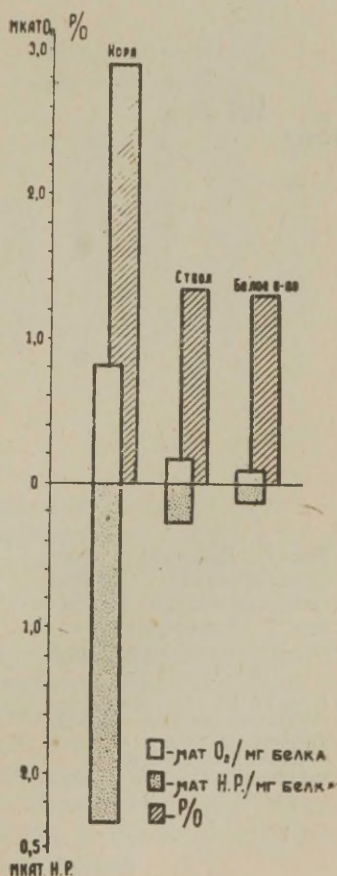


Рис. 3. Дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях различных отделов мозга кошки при использовании в качестве субстрата ГАМК.



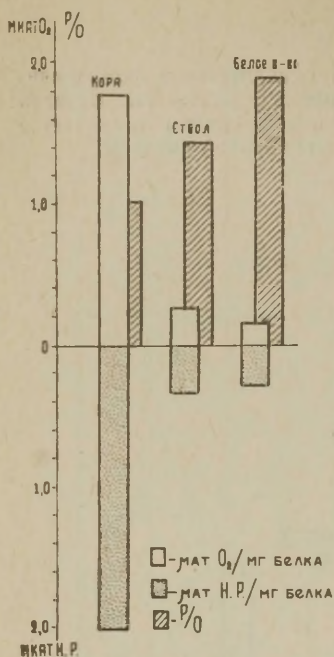


Рис. 4. Дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях различных отделов мозга кошки при использовании в качестве субстрата янтарной кислоты.

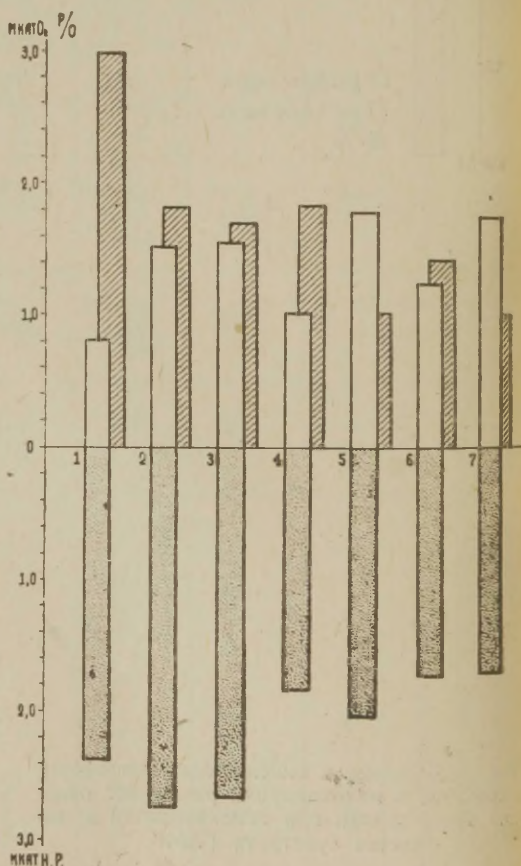


Рис. 5. Дыхание и фосфорилирование различных субстратов окисления в митохондриях коры больших полушарий мозга кошки.

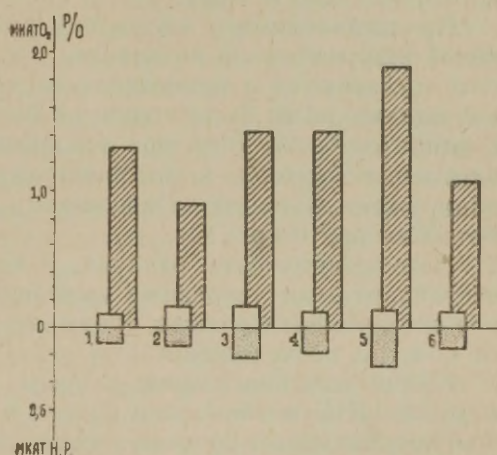
1 — ГАМК. 2 —  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота. 3 — глутаминовая кислота. 4 — пируиноградная кислота. 5 — янтарная кислота. 6 — глюкоза. 7 — НАД- $H_2$ .

окисления (рис. 4), в митохондриях коры больших полушарий отмечается более активное поглощение кислорода при меньшей по сравнению с глутаматом и ГАМК убыли неорганического фосфора. При этом величина Р/О составляет только 1,11. В митохондриях стволовых частей и белого вещества мозга при меньшей интенсивности дыхания и фосфорилирования наблюдается более высокая сопряженность этих процессов, чем в митохондриях коры больших полушарий (коэффициент Р/О в этих отделах соответственно — 1,45 и 1,89).

В целом в митохондриях коры больших полушарий (рис. 5) поглощение кислорода наиболее активно выражено на сукцинате и НАД-Н<sub>2</sub> и наименее активно на ГАМК. Убыль неорганического фосфора наиболее высока на  $\alpha$ -кетоглутарате и глутамате. Наибольшая сопряженность дыхания и фосфорилирования характерна для ГАМК и наименьшая — для сукцината и НАД-Н<sub>2</sub>. Наиболее активно окисляются глутаминовая,  $\alpha$ -кетоглутаровая кислоты и слабо — глюкоза.

Рис. 6. Дыхание и фосфорилирование различных субстратов окисления в митохондриях белого вещества головного мозга кошки.

1 — ГАМК, 2 —  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота, 3 — глутаминовая кислота, 4 — пировиноградная кислота, 5 — янтарная кислота, 6 — глюкоза, 7 — НАД-Н<sub>2</sub>.



В митохондриях белого вещества головного мозга (рис. 6) уровень всех исследуемых процессов значительно ниже, чем в сером веществе. Среди применявшихся субстратов наиболее активно окисляется янтарная и наименее активно —  $\alpha$ -кетоглутаровая кислоты.

Таким образом, интенсивность дыхания, фосфорилирования и сопряженность этих процессов при использовании исследованных субстратов максимальны в митохондриях коры больших полушарий и последовательно снижаются в митохондриях ствола мозга и белого вещества. Исключение составляет Р/О, полученный с использованием сукцината, величины которого значительно возрастают в митохондриях ствола и белого вещества мозга по сравнению с корой больших полушарий.

## Обсуждение

В литературе имеются указания на то, что в митохондриях мозга фосфорилирование на эндогенных субстратах практически отсутствует. Степень сопряженности дыхания с фосфорилированием при идентичных условиях опыта зависит от субстрата окисления (1, 10).

В работах Ловтруппа, Сактора и других показано, что в мозгу наиболее активными субстратами являются янтарная, глутаминовая и  $\alpha$ -кетоглутаровая кислоты (3, 11).

По данным Мак-Канна и Тауэра в митохондриях мозга кошки Р/О на ГАМК и пирувате составляет 2,70; на сукцинате — 2,35 (10). При использовании полярографического метода Восс и др. нашли (12), что наибольший уровень фосфорилирования в митохондриях мозга крыс на  $\alpha$ -кетоглутарате (Р/О = 2,84), несколько меньший — на глутамате и сукцинате (соответственно 1,88 и 1,98).

Представленные в настоящей работе результаты о неодинаковой окислительной активности отдельных субстратов в основном согласуются с приведенными выше литературными данными, однако нами были получены более низкие величины Р/О на сукцинате. Кроме того, при использовании в качестве субстрата окисления глюкозы в митохондриях коры больших полушарий обнаружена большая интенсивность дыхания, чем указано в работе Сактора и др. (13).

По-видимому, эти отличия, с одной стороны, обусловлены нестандартными условиями выделения митохондрий и проведения эксперимента (состав среды, температура), а также зависят от объекта исследования.

Кроме того, по нашим данным, в митохондриях различных отделов ЦНС в отношении одного и того же субстрата обнаружен неодинаковый уровень исследуемых процессов, что, по-видимому, определяется особенностями окислительного обмена отдельных клеточных популяций ткани мозга.

В то же время биохимические исследования, посвященные изучению окислительного обмена, в основном проведены на митохондриях целого мозга животных. К сожалению, вопрос об отличиях по дыхательной активности митохондрий из различных отделов мозга в литературе не нашел достаточного освещения. Имеются только указания на то, что окислительная активность митохондрий, выделенных из белого вещества мозга (состоящего в основном из глиальных клеток) на  $1/3$  ниже, чем митохондрий, выделенных из серого вещества целого мозга и представляющих собой смесь органелл нейронов и глиальных клеток.

О наличии «субстратной специфичности» отдельных типов клеток мозга свидетельствуют данные Гамбургера и др. о пре-



имущественном окислении глутамата в нейронах ядра Дейтерса по сравнению с глиальными клетками, где более активно окисляется сукцинат (14, 15).

Имеется указание, что добавление глутамата усиливает дыхание срезов коры больших полушарий, в то время как на дыхание субкортикального белого вещества оно не оказывает влияния (16).

О преимущественном окислении глутаминовой и  $\gamma$ -аминомасляной кислот в нейронах коры большого мозга свидетельствуют работы Робертса, Тауэра и др. (17, 18). По-видимому, обнаруженная в работе специфическая активность обмена ГАМК в митохондриях коры больших полушарий, по сравнению с другими исследовавшимися образованиями мозга, связана с преобладанием в метаболизме коры окисления в нейрональных элементах.

С другой стороны, согласно морфологическим и гистохимическим данным, нервные клетки разных уровней ЦНС характеризуются существенными особенностями структуры и химизма (19). В связи с этим, различия в окислении тех или иных субстратов, полученные в настоящей работе, не могут быть отнесены только за счет разного количественного соотношения нейронов и глии в этих отделах мозга. Необходимо учитывать и специфику окислительного метаболизма самих нервных клеток в них. Если большая сопряженность дыхания и фосфорилирования (коэффициент  $P/O$ ) на сукцинате в митохондриях белого вещества в значительной мере определяется обменом глии, то высокий  $P/O$  на этом же субстрате в митохондриях серого вещества ствола связан с особенностями окислительного метаболизма нейронов в этом отделе мозга. В предыдущей работе нами показано усиление активности сукцинатоксидазной системы в филогенетически более древних отделах ЦНС (20).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о наличии определенных особенностей в использовании отдельных субстратов окисления митохондриями различных отделов центральной нервной системы. Обнаруженные закономерности указывают на определенную взаимосвязь исследуемых процессов со структурной и функциональной дифференцировкой мозга.

### Выводы

При сравнении окислительной и фосфорилирующей активности ряда субстратов ( $\alpha$ -кетоглутаровая, пировиноградная, янтарная, глутаминовая,  $\gamma$ -аминомасляная кислоты, глюкоза, НАД- $H_2$ ) в митохондриях различных отделов центральной нервной системы (кора больших полушарий, серое вещество ствола и белое вещество головного мозга кошки) показано следующее.

1. Уровень дыхания, фосфорилирования и сопряженность этих процессов ( $P/O$ ) на всех использованных субстратах окис-

ления нарастает от белого вещества к серому веществу ствола и коре больших полушарий. Исключение представляет коэффициент Р/О на сукцинате, величина которого в митохондриях ствола и белого вещества больше по сравнению с корой больших полушарий.

2. Наиболее активными субстратами окисления в митохондриях мозга кошки являются  $\alpha$ -кетоглутаровая и глутаминовая кислоты, и наименее активными — глюкоза и НАД-Н<sub>2</sub>. Среднюю активность обнаруживает пировиноградная кислота.

3. Окисление ГАМК и, янтарной кислоты в митохондриях различных отделов ЦНС имеет свои особенности, проявляющиеся в том, что при низкой интенсивности дыхания на ГАМК в митохондриях коры больших полушарий уровень фосфорилирования и Р/О значительно выше, чем в митохондриях ствола и белого вещества. Активному дыханию на сукцинате в митохондриях коры больших полушарий соответствует слабое фосфорилирование и низкие величины Р/О по сравнению с другими отделами мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brody T., Bain J., J. Biol. Chem., 195, 685, 1952.
2. Abood L., Gerard R., Banks, Amer. J. Physiol., 168, 728, 1952.
3. Saktor B., Packer L., J. Neurochem., 9, 371, 1962.
4. Доведова Е. Л., Укр. биохим. журн., 38, 90, 1966.
5. Пигарева З. Д., Боголепов Н. Н., Гулидова Г. П., Доведова Е. Л., Митохондрии, структура и функции. Наука, 25, 1966.
6. Fonyo A., Somogyi J., Acta physiol. Acad. Sci., Hung., 18, 191, 1960.
7. Гулидова Г. П., Бюлл. эксперимент. биол. мед., 50, 42, 1965.
8. Ennor A., Rosenberg H., Biochem. J., 50, 524, 1952.
9. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., et. al., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
10. Mc Khann G., Tower D. B., J. Physiol., 196, 36, 1959.
11. Lovtrup S., J. Neurochem., 8, 243, 1961.
12. Voss D., Campello A., Bacila P., Biochem., Biophys. Res., Com., 4, 48, 1961.
13. Sacktor B., Packer L., Cummins J. Hackley B., Inhibition in the nervous system and  $\gamma$ -aminobutyric acid. N. Y.-Oxford, Paris, London, 182, 1960.
14. Hamberger A., J. Neurochem., 8, 31, 1961.
15. Hyden H., Pigon A., J. Neurochem., 6, 57, 1960.
16. Brierly J., McIlwain H., J. Neurochem., 1, 100, 1956.
17. Roberts E., Baxter C., IV Intern. Congress. Biochem. Vienna, 269, 1958.
18. Tower D., IV Intern. Congress Biochem, Vienna, 213, 1958.
19. Португалов В. В., Пигарева З. Д., Буснюк М. М., Доведова Е. Л., Ильина-Какуева Е. И., Труды III Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 297, 1962.
20. Доведова Е. Л., IV Научн. совещание по эволюц. физиологии, Л., 110, 1965.

# БЕЛКИ, НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И ФЕРМЕНТЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ

---

## НЕКОТОРЫЕ ГИСТО-ХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ УЧАСТИЯ РАЗЛИЧНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ СТРУКТУР НЕРВНОЙ КЛЕТКИ В СЛЕДОВЫХ ПРОЦЕССАХ (ПАМЯТИ)

А. Л. Шабадаш

Лаборатория по изучению нервных и гуморальных регуляций Академии  
наук СССР, Москва

I. Успехи анализа «кодированной записи» в ДНК передачи наследственных свойств обострили интерес к исследованию природы процессов памяти в широком плане. Логически несомненные черты сходства обеих категорий явлений оправдывают поиски аналогичных молекулярно-химических основ; некоторый успех экспериментального изучения роли нуклеопротеидов в следовых явлениях в нервной системе у примитивных организмов (напр., планарий; 1a-d, 2a-b) и сенсационные сообщения о клинических результатах применения дрожжевых рибонуклеопротеидов (РНП) породили волну публикаций, весьма неодинаковой научной ценности. Однако уже через короткое время стало ясным, что проблемы памяти весьма сложны и надежды на быстрое и упрощенное решение вопросов — необоснованы. Наличие целой серии современных обзоров (см. 3a-e, 4a, 4c) позволяет, ввиду ограниченности размеров статьи, ограничиться перечислением лишь основных положений, которые достаточны для проведения экспериментальной работы. Разнообразие аспектов и методов расшифровки явлений памяти в физиологическом, неврологическом, психологическом, биохимическом и фармакологическом плане, естественно, создает почву для расхождений и произвольного истолкования. Любопытно отметить, что в ряде исследований привлекаются и используются в качестве убедительных доказательств данные гисто-химического изучения нейронов [возможно потому, что наличие какого-то морфологического субстрата по традиции упрочивает достоверность функциональных проб (см. 4c, 4d)]. К сожалению, качество гисто-химических данных, опубликованных как иллюстрации физиолого-биохимических работ, не может удовлетворить требованиям адекватности. Можно вообще поставить вопрос: существует ли прин-



ципиальная возможность использования цитологических и гисто-химических признаков в выяснении природы и свойств столь сложного биологического явления, как память? Мне думается, что применение рациональных цито- и гисто-химических подходов — перспективно и, в условиях тесного взаимодействия с перечисленными выше направлениями исследований, продуктивно. Принципиальные возможности подчеркнуты были мною еще в 1964 г. в работе «Цитохимические показатели функциональных свойств нервной ткани» \*.

II. Необходимо, прежде всего, уточнить и определить те отправные позиции, на которые опираются наши рабочие гипотезы. Память — многообразный, сложный, цепной и разветвленный процесс, который прошел ряд эволюционно усложнившихся и диалектически преемственных ступеней. Поэтому не следует называть любые биологические явления, в которых существуют элементы «различия» (и поэтому «отбора»), «памятью», так как каждый уровень биологической организации характеризуется особыми чертами данного типа процессов, которые весьма усложняются и усвершенствуются в процессе фило- и онтогенеза. С эволюционной точки зрения отчетлива диалектика преобразований, когда примитивный тип реакции включается в «снятом виде» (и, следовательно, приобретает новые качественные черты) в последующей, более сложной ступени организации живых существ.

Мы предлагаем предварительную классификацию эволюционно-преемственных ступеней, приводящих в конце концов к сложному биологическому явлению «памяти»:

а) на *субклеточном уровне* (микросомы, митохондрии, ядрышко и т. п.) уже существует «различение» и «отбор» веществ по физико-химическим признакам: величина и конформация молекулы, распределение активных групп, электрзаряд и т. п. Суммируя наиболее типичные характеристики данного типа процессов, их следует относить к категории «комплементарных явлений»;

б) *клеточный уровень*, включающий предыдущий и преобразующий его, определяется кооперацией деятельности основных образований — мембран поверхности и эргастоплазмы, взаимосвязями митохондрий, лизосом, сетчатого аппарата с ядром и ядрышком; избирательная проницаемость и преимущественные пути метаболизма являются характерным проявлением новых свойств «клеточной памяти». Отграничение ядра от цитоплазмы существенно влияет на ход процессов, которые правильно называть цитотипическим гомеостазом (биологической стереотипией). Одним из видов этого типа реакций является «иммунологическая память», которая реализуется и фиксируется путем многократ-

\* Она появилась в печати в 1966 г. в сб.: Проблемы нейрoхимии. Изд. «Наука», стр. 53—61.

ных делений клеток и отбора цитологически видоизмененного образца. Обязательное участие в данном типе реакций ДНП и РНП — бесспорно и отчетливо. Однако, хотя кодовая «запись» в ДНП и ее транскрипция с помощью информационного рибонуклеопротеида (и-РНП), перенос транспортной РНК материала для синтеза и матрицирование с участием рибосомального РНП выступают на первый план, фиксируется и репродуцируется *тип процессов* (а не просто определенное вещество);

в) в *нервной клетке*, которая в постнатальном периоде утрачивает способность к делению, возникает особый, новый тип биологической стереотипии: специфические особенности ее свойств — *ритмическая смена* возбуждения и торможения, частотный и амплитудный код биоэлектрических сигналов обуславливают появление «следовых процессов», прообразов будущей «памяти» в собственном смысле слова. Таким образом, следовые процессы, свойственные невронитам (и в более примитивной форме — мышечной ткани), — особое эволюционное усовершенствование, органически связанное с параметрами физиологических функций;

г) в организме нейроны существуют не в одиночку, а объединены в более или менее *сложные ансамбли*, рефлекторные цепи и «конstellации» (А. А. Ухтомский), в которых процессы автоиндукции, повторной циркуляции и реципрокных отношений создают качественно новый тип реактивности; повторность, реверберация создают основу для двух типов «следовых процессов»: а) кратковременное «проторение пути»; б) «долгосрочный след», фиксация которого требует участия специальных биохимических процессов (метаморфозированных феноменов ДНП → РНП → белки), обуславливающих «готовность к действию» нейронов, их специфическую сенсibiliзацию к ответу на кодовый раздражитель;

д) «примитивная память» как усложненная форма следовых процессов возникает в эволюционном ряду вместе с формированием «*мозговых*» отделов, их цефализацией и появлением условных рефлексов, т. е. при сочетании «немых» соматических и вегетативных «сигналов» с реакцией высших отделов нервной системы на раздражение органов чувств;

е) наконец — собственно память как высшая форма нейропсихических процессов при участии многих разделов центральной нервной системы (в частности, лимбической системы и «вегетативного мозга» Папеца) *включает* все низшие типы, но не сводима к их простой сумме.

Из этого схематического перечня очевидно, что для всей последовательности эволюционно усложняющихся явлений общим является кинетика преемственных процессов. Разумеется, каждый из них использует адекватные субстраты, однако, нет оснований предполагать наличие одного особого «вещества памяти»



(а тем более — идентифицировать его с рибонуклеопротеидами рибосом неврочита, см. 5). Для расшифровки этой крайне сложной проблемы продуктивнее выяснять особенности типа реагирования, в котором, разумеется, существуют «критические зоны», а некоторые вещества могут занимать «ключевые позиции» и иметь характер «триггера» — инициатора, активирующего (либо — наоборот — обрывающего) развитие цепи. Учитывая со всей серьезностью их важность, недопустимо, однако, подменять ими явление в целом.

III. Эволюционный подход к проблемам памяти убеждает в наличии двоякой их характеристики:

а) сохранение у сложных организмов примитивных общеклеточных форм реакции на получаемую информацию в составе усложнившихся типов «узнавания», «отбора» и хранения; б) появление новых «надстроек», с особыми параметрами лабильности реакции и формировании «следа», что свойственно нервной системе, приобретающей функции основного механизма регуляции и координации.

Следует согласиться, что центральное место в этих явлениях на клеточном и системном уровнях занимают нуклеопротеиды. Однако все современные достижения биохимии и гистохимии предостерегают от ошибочности их валового, суммарного исследования. Странными выглядят попытки тотальной биохимической экстракции из нервной системы подопытных животных, или введения токсических доз РНКазы (5), как и суммарной гистохимической характеристики (6) нуклеопротеидов для выяснения природы «следа», а тем более — памяти. Учитывая прочно доказанные особенности дву- и односпиральной ДНК и комплексирования с ними белков и других противоионов, существование информационных, транспортных и рибосомальных РНК (и соответствующих симплексов с их участием, см. обзоры 7) и, наконец, своеобразие топографического распределения нуклеопротеидов в конкретных клеточных органоидах (см. 8а-ж), необходимо *дифференцированное исследование* различных систем нуклеопротеидов в клеточной реактивности. Об этом обязательном условии продуктивного подхода к изучению биологических явлений я неоднократно высказывался (8д-ж, 10) и поэтому считаю сейчас возможным ограничиться подчеркиванием этого тезиса.

Профиль конференции концентрирует наше внимание на химизме процессов в нервной системе. Наш доклад является гистохимическим аспектом проблемы, изложенной в работе П. А. Кометиани (см. наст. сборник). Нас объединяет ряд общих точек зрения, которые возникли независимо в процессе изучения и поэтому, по-видимому, могут быть приняты как рабочая гипотеза. Центральное ее звено выражено в убеждении, что «следовые явления» на клеточном уровне и различной сложности «память» в целостной нервной системе реализуются путем активации пре-



емственно сложившейся констелляции нейронов; следовательно, предполагается преимущественная сенсibilизация конкретной системы нейронов к воспроизведению соответствующего «следового процесса» (или в психической сфере — мыслительного эквивалента) путем изменения потенциала мембран, мобилизации нейрогуморов, активации или добавочного синтеза некоторых ферментов и т. д. Отвлекаясь, пока, от многообразия путей формирования памяти и полиморфизма участвующих звеньев, мы считаем возможным и реальным исследование преимущественной «готовности к действию» на *клеточном уровне* с помощью гисто-химических методов. В первую очередь, для этой цели пригодны методы характеристики электроколлоидальных свойств мембранных структур и важнейших органоидов нервного центра\*.

IV. Итак, наиболее вероятной физиологической предпосылкой «следовых явлений» являются изменения порогов возбудимости нероцита, которые, в сочетании со свойственной им повторностью (итеративностью, реверберационными цепями, Лоренте де Но), фиксируют стереотипию непосредственных и «отсроченных» ответов. Физиологические исследования последнего десятилетия В. С. Русинова, Ардуини с сотр., Моррела (см. 9а-d) и др. являются прочной основой для такого суждения. Так, В. С. Русинов (9а) показал, что анодическая поляризация коры мозга кролика слабым постоянным током создает в ней очаг возбуждения, в результате чего индифферентные (и подпороговые ранее) раздражители становятся эффективными; если очаг «доминанты» создавался пульсирующим током, то он сохраняет «память» о ритме тока в течение многих часов.

Таким образом, можно считать, что первые этапы формирования «следа» в нероцитах связаны с изменением электроколлоидных свойств синаптических терминалий, мембран и мобильных органоидов нервной клетки.

Сущность предложенного мною гисто-химического метода исследования динамики изменений электрорядов РНП, ДНП, глюко- и фосфопротеидов состоит: а) из прижизненной внутриартериальной фиксации особыми ферментно- и субстратностабилизирующими смесями; б) из определения изоэлектрической точки (ИЭТ) путем сорбции катионного красителя и регистрации ее в логарифмической шкале значений рН; в) серийном и статистически верифицированном изучении каждого эксперимента и их совокупности в целом. Ответ — четок и соответствует двоичной системе учета (есть сорбция или она отсутствует). Поскольку метод и многочисленные результаты его применения неодно-

---

\* Наш опыт изучения некоторых форм реакций лимфоидных клеток на антиген (12) и взаимодействия клеток культуры тканей с вирусами (13) без труда выявляет черты сходства и специфические отличия клеточных процессов.

кратно описаны (см. 8, 10, 11, 13, 17), мы, экономя место, ограничимся названными ссылками. Ввиду полной невыясненности вопроса о гисто-химических эквивалентах «следовых явлений», наши исследования первоначально проводились с использованием энергичных раздражителей для выявления массового характера ответа на клеточном уровне. Реактивные изменения электро-коллоидальных свойств мембран на границе синанс/невроцит и сопутствующие физико-химические превращения органоидов данной зоны при современном состоянии науки учитываемы методами биофизики (изменения биопотенциала; ионные сдвиги и т. д.) и гистохимии: выявленная нами динамика перепадов ИЭТ синаптического и субсинаптического комплекса является первым, но конкретным шагом в исследовании этих явлений. Общая, результирующая ИЭТ сложной структуры синапса, в мембранах которого участвуют фосфо- и гликопротеиды и ферментные белки, содержится «пузырьки» с медиаторами и митохондрии, соответствует (в состоянии покоя) более щелочным значениям pH, чем аналогичные показатели тела невроцита и его органоидов; так, напр., у кошек в состоянии относительного покоя ИЭТ синаптических «бутонов» определялась в зоне pH 4,8—5,0; после блокады подкормки барбитуратами наблюдается кислотный сдвиг ИЭТ (примерно до pH 4,2); проникающие излучения и судорожные яды увеличивают смещение ИЭТ (до pH 3,8; 10). В то же время в цитоплазме иннервируемого невроцита происходят противоположно направленные изменения ИЭТ РНП мембран и митохондрий, а именно — в щелочном (от контроля) направлении (см. 11)\*. Встречные сдвиги ИЭТ синапсов и тела нервной клетки при сильном (или длительно действующем раздражителе) можно расценивать как «ввод в действие» синапса путем установления оптимальных различий ИЭТ и факторов активности в пре- и постсинаптических зонах. В самом деле, кислотный сдвиг ИЭТ синапса соответствует высвобождению биогенных аминов и «обнажению» кислотных групп фиксированных в структурах анионитов и сопоставим с анодической поляризацией Русинова, Ардуини, Морелла и т. п. (9). Щелочной сдвиг в РНП митохондрий и эргастоплазмы сопряжен со связыванием кальция и вытеснением калия, что повышает готовность невроцита к электрогенезу и изменяет ионный градиент; одновременно сдвиг указывает на вероятность присоединения гистоноподобных белков из ядра (т. е. устранение части репрессоров ДНК) и акцепцию информосом, в которых отношение белка к РНК равно 3; следствие ядерно-митохондриальных взаимодействий может стать поводом к син-

---

\* Нами (см. 24) доказано, что появление направленной вирусной восприимчивости в клетках культуры ретикулярной ткани, т. е. фиксированная «иммунологическая память» сопровождается (или обуславливается), как и в невроците, значительным щелочным сдвигом ИЭТ цитоплазмы и важнейших органоидов.



тезу ферментных белков типа киназ. Важно отметить, что в ответ на раздражение в субсинаптической зоне наблюдается отчетливое сосредоточение митохондрий, по-видимому, активное (ср. данные по фибробластам, 14); описываемые нами физико-химические сдвиги ИЭТ обязывают вспомнить утверждение ряда авторов (напр. 15, 16) о роли митохондрий в качестве «ионных насосов», локально изменяющих соотношения калия и кальция, ионов водорода и гидроксила.

По срокам возникновения (секунды), максимуму выраженности (первый час) и длительности существования (несколько суток) перечисленные выше гистохимические показатели коррелируют с временными параметрами ранней фазы «следовых явлений». Налицо предпосылки синтеза митохондриями (и эргастоплазмой?) ферментных или медиаторных веществ, что, наряду с высвобождением калия, качественно отличает «сенситизированные» невроны.

Мы вправе полагать, что даже первые этапы «следовых процессов» характеризуются конкретными цитохимическими эквивалентами, которые, являясь *признаками* происшедших изменений, позволяют в некоторой степени судить и о механизмах преимущественного вовлечения («стигматизация») конкретной констелляции нейронов. Отметим попутно, что инъекция РНК-азы в мозг вызывает прежде всего изменения электрзаряда клеток, эффект которого в данном случае существеннее возможного ферментативного действия.

V. Особую и важную роль в фиксации и упрочении «следовых явлений» играют нуклеопротеиды ядрышка. Ядрышковые механизмы регуляции клеточной деятельности изучены еще недостаточно, хотя их участие в информосомной связи ядра и цитоплазмы требует пристального внимания, в частности и для выяснения проблем следовых явлений. Нами (17) обнаружены в ядрышке невронитов 5 типов РНП, различающихся своей ИЭТ, морфологией распределения и реактивностью. Мы ограничимся обсуждением лишь одного из них — особого комплекса, названного «ядрышковый гибридный нуклеопротеид» (ЯНГ)\*, (см. 18). Входящие в состав ЯНГ компоненты, ДНП и РНП, могут быть гистохимически выявлены отдельно (реакцией Фельгена или реакцией Шабадаша) либо — в общем комплексе. Цитологически они оформлены в виде своеобразных выростов («шапочек») по внешнему контуру ядрышек. В зависимости от фазы активности ядрышка (и клетки в целом), число и, особенно, величина «шапочек» значительно возрастают; они отшнуровываются от ядрышка и мигрируют к ядерно-цитоплазменной грани-

\* Наличие комплекса ЯНГ подтверждено в 1969 г. прямыми биохимическими анализами РНП (из ядер вилочковой железы): в нем содержалось около 4% прочно связанной ДНК (Н. Наога, Biochim. Biophys. Acta, 174, p. 137).



це; во многих случаях их величина в это время может достигать первоначальных размеров самого ядрышка. Вблизи ядерной оболочки ЯНГ диссоциирует, и его ДНП остается в кариоплазме, тогда как РНП переходит в цитоплазму. Этот переход — очевидно через поры ядерной оболочки — осуществляется либо мелкими, субмикроскопическими глыбками РНП, либо — в условиях крайнего регенеративного напряжения или фармакологического «подстегивания» — целыми фрагментами ядрышка, которые обнаружимы микроскопически в цитоплазме.

Два факта имеют кардинальное значение. Во-первых, РНП в ЯНГ сочетается с *экстрахромозомальным* ДНП и, видимо, возникая на этой матрице, представляет ее подобие, т. е. является и-РНП; это заключение учитывает характерную ИЭТ (соответствующую рН 5,0—5,5), которая значительно отличается от ИЭТ обычных рибосом. Используя данные ряда авторов (см. А. С. Спирин, 19) о значительном проценте белков в и-РНП (75%, по сравнению с 25—40% в обычных рибосомах), следует признать нашу гистохимическую диагностику достаточно обоснованной, так как увеличение доли белка обязательно приводит к сдвигу ИЭТ в щелочную сторону. Во-вторых, избирательный ферментолит РНКазой удаляет РНП из ЯНГ, а сохранившийся ДНП четко выявляется по Фельгену; но после действия очищенной ДНКазы II исчезает не только ДНП, но и не обнаруживается гистохимически РНП, т. е. происходит лабилизация и растворение РНП во время инкубации. Отсюда можно заключить, что связь РНП с ДНП в ЯНГ достаточно интимна и суждение о ее репликативном генезе в достаточной мере аргументировано (см. 24).

В различных экспериментальных условиях (и не только в нервной ткани) динамика преобразований ЯНГ наблюдается вполне отчетливо: при повреждении аксонов и регенеративном их восстановлении, после массивного, но не смертельного действия ионизирующего облучения и при фармакологическом выключении синтеза белков либо РНК, — что особо интересно для обсуждаемой нами проблемы фиксации следовых явлений. Известно, что введение пуромицина в мозг «стирает» память на изученные действия у мышей и крыс (L. Flexner a. al., 20). Сопоставление гистохимических картин нервной ткани (и параллельной модели культуры тканей, к которой добавляли 50—100 гамм/мл. пуромицина) выявляет в первые 2 часа бурное увеличение количества ЯНГ, их отшнуровку и выброс, в буквальном смысле слова, в цитоплазму. Через 10 час. до 30% клеток содержат «микроядрышки» ЯНГ в цитоплазме, а затем начинаются их истощение и дегенеративные изменения клеток. При меньшей дозировке пуромицина наблюдается увеличенная диссоциация РНП из комплекса ЯНГ, однако при сохранении «основы» ДНП. Предварительное подавление репродукции РНП

актиномицином Д исключает эффект увеличения «шапочек» ЯНГ и их бурного перемещения в цитоплазму. По данным Barrondes a. al. (21), Ф. З. Меерсона (22) и др., при этом осложняется формирование новых условных рефлексов и, в особенности, феномен их упрочения. Таким образом, физиолого-химическое действие обоих агентов на следовые процессы отображается в различных гистохимических картинах, обнаруживаемых нашими методами, которые и могут быть использованы как индикаторы передачи информации из ядра в цитоплазму. Следовательно, уже в настоящее время существует по крайней мере три гистохимических признака для учета следовых явлений на клеточном уровне: а) изменения электроколлоидальных свойств синапсов и субсинаптической зоны неврона; б) сдвиги ИЭТ и изменения градиента ионов (в первую очередь — калия и кальция) при сопутствующих сдвигах окислительного фосфорилирования, синтеза ферментов и нейромедиаторов в митохондриях; в) накопление и выделение РНП, типа информосом, в ядрышке. Наблюдаемые гистохимические процессы коррелируют с биохимическими данными, характеризующими общебиологические закономерности преемственных процессов передачи информации и кодовых механизмов на клеточном уровне. В соответствии с этим и наши наблюдения значимы не только для невронитов, но и для других типов клеток (в частности, для культур тканей при воздействии на них вирусов, см. 13,24). Однако это лишь начало пути. Для выяснения процессов *системного порядка*, т. е. реально существующих в нервной системе взаимоотношений, необходимо исследование всех преемственных звеньев цепи рефлекторных механизмов, включая у. высших позвоночных сложные корково-подкорковые аппараты бодрствования и упрочения восприятий (ретикулярную субстанцию, лимбическую систему и «вегетативный мозг» Папеца).

VI. Резюмируем наши данные.

1) Нуклеопротейиды — различные типы РНП, комплекс РНП и ДНП в ядрышке (ЯНГ) и ДНП — являются обязательными участниками клеточной реактивности. Особенно отчетливы их гистохимические изменения в невронитах; в частности, некоторые физико-химические процессы в синапсах и цитоплазме, в митохондриях и ядрышке могут быть связаны с формированием «следа» (в первую минуту и до 1 часа) и его упрочением (кривая вариаций в течение 72—96 часов).

2) Реакции невронитов — а в центральной нервной системе также и глиоцитов — выражены с различной интенсивностью в последовательно включающихся в ответ системах и «этажах» спинного и головного мозга. Предложенные нами гистохимические методы пригодны для выяснения относительного участия в сложных следовых явлениях каждого из звеньев цепи процессов (афферентных, рефлекторных, интегративных и т. п.).



3) Особое место РНП в изменениях клеточных и субклеточных структур обусловлено тем, что они являются: а) полимерным фондом нуклеотидов и коферментов для основных метаболических превращений; б) специфическими переносчиками информации, информосомами; в) матрицей синтеза белков, в том числе ферментативных и акцепторных. Поэтому они участвуют в разнообразных реакциях.

4) Суммарное, валовое изучение смеси нуклеиновых соединений из различных органоидов клетки неперспективно для выяснения существа явлений памяти, ибо при этом нивелируются существенные несходства во времени и качестве изменений. Первостепенную роль в осуществлении следовых реакций — иначе говоря, в преимущественной сенсibilизации динамической констелляции невротитов — играют РНП митохондрий и ЯНГ ядрышка, контролирующие уровень биологически активных веществ в клетке.

5) Преждевременно утверждать, что физиологическая природа следовых явлений в нервной системе прямо и непосредственно превращается в систему хранения и считывания памяти. Вероятна более сложная, опосредованная и ступенчатая зависимость, связанная с изменениями форм кодирования. Память, в нашем представлении, возникает путем сложной трансформации следовых явлений в последовательных звеньях цепи. Представленные гисто-химические данные полезны как начальная форма выяснения локализации и некоторых физико-химических превращений важнейших органоидов невротитов в процессе следовых явлений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. а) Chamberlain T. J., Rothschild G. H., Gerard R. W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **49**, 918, 1963.
- б) Chamberlain T. J., Halik P., Gerard R. W., J. Neurophysiol., **26**; 662, 1963.
- с) Jacobson A. L., Fried C., Horowitz S. D., Nature, **209**, N 5023, 599—601, 1966.
- д) MacConnell I. V., J. Neuropsychiatr., **3**, Suppl. I, 542, 1962.
2. а) Corning W. C., John E. R., Science, **134**, 1363, 1961.
- б) Baxter R., Kimmel H. D., Amer. J. Psychol., **76**, 665, 1963.
3. а) Morrel Fr., Physiol. Reviews, **41** (3), 443, 1961.
- б) Delafresnaye Y. F. (edit), Brain Mechanisms and Learning A Symposium, Oxford, 1961.
- с) Humphrey G., Coxon R. V., The chemistry of thinking, Ch. Thomas publ., USA, 1963.
- д) Wiener N., Schade Y. P. (edit.), Nerve, Brain and Memory Models (Progress in brain research Vol. 2) 1963.
- е) Dingman W., Sporn M. B., Science, **144**, 26, 1964.
- ф) Gauhgh J. L., Petrinovich L. F. in: Internat. Review of Neurobiology, **8**, 139—196, 1966.
- г) Тонгур В. С., Крылов О. А., Данилова Р. А., Успехи современной биологии **60**, № 3(6), 336—348, 1965.
4. а) Morrel Fr., in: "Brain Mechanisms and Learning", Oxford, Blackwell, p. 375, 1961.



- b) Morrel Fr., Abstr. of 23 Internat. Congress Physiol. Sci., Tokyo, p. 24., 1965.
- c) Morrel Fr., in: "Information Storage and Neural Control", ed. by W. S. Fields and W. Abbott, 1966. Ch. Thomas USA.
- d) Kogan A. B., Abstr. of 23 Intern. Congr. Physiol. Sci., Tokyo, p. 68, 1965.
5. Тонгур В. С., Крылов О. А., Данилова Р. А., Журн. высш. нервной деятельности, 15, № 1, 79, 1965.
6. Баранов М. Н., Певзнер Л. З., Биохимия, 28 (6), 958—963, 1963.
7. а) Спирин А. С. (ред.), Биосинтез белка и нуклеиновых кислот, Москва. Изд. «Наука», 1965.
- б) Коникова А. С., Крицман М. Г., Пути синтеза белка. Москва, Изд. «Медицина», 1965.
8. Шабаташ А. Л.
  - а) Доклады Акад. Наук СССР, 114, 658, 1957.
  - б) Архив анат., гистол. и эмбриол., т. 35, № 1 и № 4, 1958.
  - в) Цитология, 1, 15, 1959.
  - г) Радиобиология, 1, 212, 1961.
  - д) Журн. общ. биол., 23, 321, 1962.
  - е) в кн.: «Митохондрии, структура и функции», Москва, Изд. «Наука», стр. 5—22, 1966.
  - ж) в кн.: «Проблемы нейрхимии». Москва-Ленинград, Изд. «Наука», стр. 53—61; 1966.
9. а) Русинов В. С., в кн.: Электроэнцефалографические исследования высшей нервной деятельности», 1962, Изд. АН СССР, в кн.: «Бионика», Москва, Изд. «Наука», стр. 401—409, 1965.
- б) Arduini A., Mansia M. M., Mechelce K., Arch. Ital. Biol., 95, 127, 1957.
- с) Arduini A., in: "Reticular Formation of the Brain", Boston, 1958.
- д) Morrel F., Ann. New York Acad. Sci., 92, 860—876, 1961.
10. Шабаташ А. Л., в кн.: Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы», Ереван, стр. 283—295, 1963.
11. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д.
  - а) ДАН СССР, 128, 1290, 1959.
  - б) ДАН СССР, 136, 222, 1961.
  - в) Радиобиология, 2 (1), 105—114, 1962.
  - г) ДАН СССР, 145, 657, 1962.
  - д) Архив анат., гистол. и эмбриол., 64, № 2, 3—9, 1963.
12. Шабаташ А. Л., Краскина Н. А., Бюлл. Моск. О-ва Испытат. Природы. Отд. биол., № 3, 1960.
13. Шабаташ А. Л., Залкинд С. Я., Изакова Л. П., Журн. общ. биологии, 27; № 4; 1966.
14. Frederic J., Archivs de Biologie (Liège), 59, 1958, 167.
15. Bourne G. H., Division of Labour in Cells, 1962. N. Y., Acad. Press.
16. Mitchell P., Nature, 191, 144, 1961.
17. Шабаташ А. Л., Зеликина Т. И., Аграчева Н. Д.
  - а) ДАН СССР, 155 (№ 2), 445—447, 1964;
  - б) Бюлл. Москв. О-ва Испытат. Природы, 69; № 6; Отд. биол.; 148—149, 1964.
18. Шабаташ, А. Л., Бюлл. Москов. О-ва Испытат. Природы, 71, № 2; 167—168, 1966.
19. Спирин А. С., Белицына Н. Н., Успехи совр. биологии, 59 (2); 187—204; 1965.
20. Flexner I. B., Flexner L. B., Stellar E., Science, 141, 57, 1963.
21. Barondes S. H., Jarvik M. E., J. Neurochem., 11, N 3, 187—197, 1964.
22. Barondes S. H., Nature, 205, N 4966, 18—12, 1965.
23. Меерсон Ф. З., Журн. высшей нервн. деятельности, № 2, 1966.
24. Шабаташ А. Л., Хесин Я. Е., Хемчян Л. Б., Бюлл. эксп. биол. мед., 1969, № 12.

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Я. В. Белик, Я. Т. Терлецкая, Л. С. Смерчинская

Институт биохимии Академии наук Укр. ССР, Киев

Ранее была показана низкая интенсивность обновления белков митохондриальной фракции, выделенной из ткани головного мозга общепринятым методом дифференциального центрифугирования (1—3). Однако эти данные трудно было согласовать с активной ролью митохондрий в клеточном метаболизме, особенно с утвердившимся в последние годы представлением о способности этих органоидов к автономному биосинтезу белка (4—9).

Учитывая значительную морфологическую гетерогенность неочищенной митохондриальной фракции, выделенной из такой крайне неоднородной по своей структуре и функции ткани, какой является нервная ткань, можно было думать, что столь низкая обновляемость белка в этой фракции обусловлена наличием в ней структур, содержащих метаболически инертные белки. К таким структурам может быть причислен миэлин, в составе которого имеются медленно обменивающиеся белки — протеолипиды (10—13).

Уиттейкер (14) разработал метод разделения фракции неочищенных митохондрий мозга в градиенте плотности сахарозы на подфракции, содержащие более однородные по своим седиментационным свойствам структуры нервной ткани (миэлин, нервные окончания, синаптические везикулы, митохондрии). Применяв предложенный принцип и приспособив их метод к существующим в лаборатории условиям, мы поставили перед собой задачу получить субмитохондриальные фракции с преимущественным содержанием в каждой из них определенных внутриклеточных структур, охарактеризовать эти фракции по морфологическому составу и ферментативным свойствам, а также исследовать интенсивность обновления их белков.

В измененном виде метод фракционирования неочищенных митохондрий мозга сводится к следующему. Из 10%-ного гомогената головного мозга кроликов (или кошек), приготовленного на 0,32 М растворе сахарозы, выделяли центрифугированием фракцию неочищенных митохондрий (11500 g, 20 мин.), отделив предварительно ядерную фракцию (980 g, 10 мин.). Суспензию неочищенных митохондрий в 0,32 М растворе сахарозы последовательно центрифугировали при 50000 g в течение 60 мин. в прерывистом градиенте плотности сахарозы (0,32—0,8 М и 0,8—1,2 М), используя для этого угловой ротор рефрижераторной центрифуги Superspeed-25. Схема фракционирования неочищенных митохондрий представлена на рис. 1. Фракции отсасы-

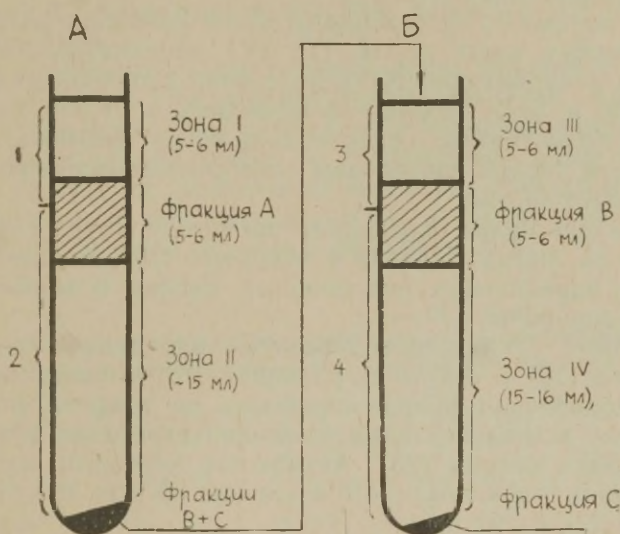


Рис. 1. Схема фракционирования неочищенных митохондрий мозга в прерывистом градиенте плотности сахарозы.

А — 1-е центрифугирование (50 000 g, 60 мин.). Б — 2-е центрифугирование (50 000 g, 60 мин.). 1 — 8 мл суспензии митохондрий в 0,32 М сахарозе; 2 — 20 мл 0,8 М сахарозы; 3 — 8 мл суспензии фракции В + С в 0,8 М сахарозе; 4 — 20 мл 1,2 М сахарозы.

вали при помощи шприца с длинной иглой. Были получены три основных фракции (две — на границе раздела сахарозных слоев после первого и второго центрифугирований и третья — в осадке после второго центрифугирования), названные соответственно фракциями А, В, С, и 4 промежуточных зоны, обозначенных как I, II, III и IV.



Электронномикроскопическими исследованиями, проведенными нами совместно с сотрудниками лаборатории электронной микроскопии Института эволюционной биохимии и физиологии АН СССР (Ленинград) и Института экспериментальной и клинической онкологии Министерства здравоохранения УССР (Киев), показано, что фракция А содержит в основном миэлиновые фрагменты различных размеров. Фракция В более гетерогенна по своему морфологическому составу. Она содержит в большом количестве синаптические везикулы и деформированные мембраны; обнаруживаются также миэлиновые фрагменты и митохондрии. Фракция С содержит преимущественно митохондрии различных размеров и степени сохранности и набухания. Наряду с митохондриями, в фракции С обнаруживаются небольшие плотные тельца типа лизосом.

В выделенных субмитохондриальных фракциях (А, В, С) и в промежуточных зонах (I, II, III, IV) определяли содержание белка, его радиоактивность (в отдельной серии опытов), содержание РНК и ДНК (только во фракциях А, В, С), активность сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный фермент), кислой фосфатазы и кислой протеиназы (лизосомные ферменты) и нейтральной протеиназы.

Содержание белка определяли по методу Лоури (15), а РНК и ДНК — по методу Цанева и Маркова (16), модифицированному для определения нуклеиновых кислот в нервной ткани Броун и Гончаровой (17, 18).

Активность сукцинатдегидрогеназы определяли по методу Кун и Эбуд (19) с той лишь разницей, что в наших исследованиях калибровочная кривая строилась по трифенилформазану, полученному восстановлением трифенилтетразолия при помощи гидросульфита натрия (20). Активность фермента выражали в мкг формазана, образованного в течение 30 мин. инкубации при 37°C и pH 7,6, на мг белка.

Активность кислой фосфатазы определяли несколько измененным методом Флекснеров (21), с использованием в качестве субстрата  $\beta$ -глицерофосфата натрия, и выражали в мкг неорганического фосфора, отщепленного в течение 60 мин. инкубации при 37°C и pH 5,0, на мг белка.

Активность кислой протеиназы определяли гемоглобиновым методом Ансона (22), с использованием в качестве субстрата бычьего гемоглобина, и выражали в мкг тирозина, отщепленного в течение 60 мин. инкубации при 37°C и pH 3,8, на мг белка.

Для определения активности нейтральной протеиназы в исследуемых субмитохондриальных фракциях мы применили предложенный Веремеенко (23) микрометод определения протеолитической активности трипсина с использованием в качестве субстрата протаминсульфата. Активность фермента выражали в мкг аргинина, отщепленного в течение 40 мин. инкубации при

37°C и рН 7,5, на мг белка. Количество отщепленного аргинина в безбелковом фильтре определяли измененным методом Сакагуши (24).

Для исследования обменной активности белков выделенных субмитохондриальных фракций подопытным животным (кошки) за 2,5 часа до забоя подкожно вводили метионин- $S^{35}$  в дозе 130 мкюри на кг веса. После обработки белков по принятой в нашей лаборатории методике (3,25) подсчитывали их радиоактивность при помощи торцовой трубки Т-25-БФЛ на установке ПС-5М. Результаты выражали в имп./мин./мг белка.

В выделенных субмитохондриальных фракциях белок распределяется весьма неравномерно (табл. 1). В фракциях А, В и С содержится свыше 60% белка фракции неочищенных митохондрий, из них 26,5% в фракции А, 20% — в фракции С и 16% — в фракции В. Немногим более 30% белка выявлено в промежуточных зонах.

В трех основных субмитохондриальных фракциях (А+В+С) содержится около 75% общего количества РНК и менее 40% общего количества ДНК, найденных в исходной фракции неочищенных митохондрий (табл. 1). Содержание ДНК на единицу белка в каждой из субмитохондриальных фракций практически одинаково, тогда как содержание РНК на единицу белка в фракции В в два раза выше, чем в фракциях А и С.

Таблица 1

Характеристика субмитохондриальных фракций ткани головного мозга

Фракции		Белок (в %)	$\frac{P \text{ РНК}}{\text{белок}}$	$\frac{P \text{ ДНК}}{\text{белок}}$	Удельная активность сукцинатде- гидрогеназы
Митохондрии Фракции:	общие	100	—	—	6,8
	А	26,5	1,6	0,5	} 2,9
	В	16,3	3,3	0,5	
	С	20,0	1,6	0,6	9,7
Зоны:	I	6,9	—	—	0
	II	11,4	—	—	0
	III	4,0	—	—	0
	IV	10,1	—	—	0

Определение активности сукцинатдегидрогеназы в субмитохондриальных фракциях показало, что в фракции С удельная активность этого фермента в 3,0—3,5 раза выше, чем в фракциях А и В (табл. 1). Это свидетельствует о преимущественном содержании в фракции С митохондриальных структур, что подтверждено нами и электронномикроскопически. Пока трудно сказать, каково происхождение сукцинатдегидрогеназной актив-



ности в фракциях А и В. Возможно, что в этих фракциях содержатся примеси митохондрий. Электронномикроскопически это подтверждается для фракции В. Однако не исключено, что часть сукцинатдегидрогеназной активности в этих фракциях представлена экстрагированным из митохондрий ферментным белком, который адсорбировался на структурах фракций А и В. В промежуточных зонах (I, II, III, IV) сукцинатдегидрогеназная активность настолько низка, что использованным методом не обнаруживается.

Выделенные субмитохондриальные фракции отличаются между собой и по активности других ферментов (табл. 2). Два из определяемых нами ферментов — кислая фосфатаза и кислая протеиназа, которые признаны специфическими ферментами особых внутриклеточных структур — лизосом, выявлены нами в основном в более тяжелых субмитохондриальных фракциях (В, С и зона IV). Свыше 80% кислой протеиназы и около 60% кислой фосфатазы содержится именно в этих трех фракциях. Если еще учесть, что общий выход активности кислой протеиназы в субмитохондриальных фракциях на 16—17% выше выхода кислой фосфатазы, то можно говорить о практически одинаковом содержании этих двух кислых гидролаз в тяжелых субмитохондриальных фракциях. Это, вероятно, свидетельствует о том, что и кислая протеиназа, и кислая фосфатаза локализованы в одних и тех же внутриклеточных структурах — в лизосомах. Электронномикроскопический контроль выделенных нами субмитохондриальных фракций показал, что структуры типа лизосом сосредоточены в основном в более тяжелых фракциях.

Удельная активность кислых гидролитических ферментов самая высокая в этих же трех более тяжелых субмитохондриальных фракциях (табл. 2). Кислая фосфатаза в этих фракциях в 1,5—2,0 раза, а кислая протеиназа — в 3—4 раза выше, чем в легких субмитохондриальных фракциях. Правда, столь же высокая удельная активность кислой фосфатазы и кислой протеиназы найдена и в промежуточной зоне III, которая отличается сравнительно небольшим содержанием ферментов (6—7% от общего содержания их в исходной фракции неочищенных митохондрий), но очень малым количеством белка (всего 4%).

Интересно, что, наряду с высокой активностью гидролитических ферментов в III и IV промежуточных зонах, в них не обнаружена активность сукцинатдегидрогеназы. Эти данные можно рассматривать как доказательство существования в нервной ткани особых внутриклеточных структур, содержащих набор гидролитических ферментов, но не обладающих сукцинатдегидрогеназной активностью.

Высокая активность кислых гидролитических ферментов в тяжелых субмитохондриальных фракциях, которые, если судить по условиям их получения в градиенте плотности сахарозы, не



Таблица 2

Активность ферментов в субмитохондриальных фракциях ткани головного мозга кролика ( $M + m$ )

Фракции	Кислая фосфатаза		Кислая протеиназа		Нейтральная протеиназа	
	Общая актив- ность (%) ( $n = 6$ )	Удельная ак- тивность ( $n = 6$ )	Общая актив- ность (%) ( $n = 5$ )	Удельная ак- тивность ( $n = 5$ )	Общая актив- ность (%) ( $n = 8$ )	Удельная ак- тивность ( $n = 8$ )
Митохондрии неочищен- ные	100	$5,8 \pm 0,2$	100	$110,6 \pm 4,5$	100	$20,4 \pm 0,9$
Зона I	$4,6 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,5$	$47,1 \pm 7,9$	$6,8 \pm 0,4$	$17,7 \pm 1,2$
Фракция A	$18,1 \pm 1,8$	$3,7 \pm 0,1$	$11,4 \pm 1,4$	$46,4 \pm 2,5$	$54,9 \pm 3,8$	$32,3 \pm 0,8$
Зона II	$9,6 \pm 1,3$	$4,9 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,5$	$70,7 \pm 8,3$	$19,6 \pm 1,3$	$30,2 \pm 2,8$
Зона III	$5,8 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,3$	$203,3 \pm 16,7$	$5,1 \pm 0,6$	$24,4 \pm 4,6$
Фракция B	$17,1 \pm 1,1$	$6,6 \pm 0,4$	$21,9 \pm 1,0$	$149,3 \pm 14,5$	$12,5 \pm 1,2$	$15,3 \pm 1,3$
Зона IV	$14,3 \pm 2,3$	$8,1 \pm 0,8$	$27,6 \pm 3,1$	$299,2 \pm 30,8$	$9,5 \pm 0,9$	$23,9 \pm 2,2$
Фракция C	$28,1 \pm 2,0$	$8,2 \pm 0,3$	$33,3 \pm 2,0$	$186,1 \pm 11,6$	$9,6 \pm 1,1$	$14,8 \pm 1,6$

должны содержать заметного количества растворимых белков, позволила предположить, что ферментативная активность в этих фракциях обусловлена белками, которые связаны с внутриклеточными структурами. С целью проверки этого предположения в одном из опытов субмитохондриальные фракции А, В и С, предварительно разбавленные до конечной концентрации сахара 0,32 М, были разделены центрифугированием (75000 g, 120 мин.) на осадок, состоящий из внутриклеточных структур, и надосадочную, содержащую растворимые белки. Оказалось, что практически вся активность кислой протеиназы и кислой фосфатазы сосредоточена в осадках. Здесь же найдено от 80 до 92% белка исходных субмитохондриальных фракций. Эти данные подтверждают предположение о том, что кислые гидролазы, содержащиеся в субмитохондриальных фракциях А, В и С, связаны со структурами.

Данные о распределении активности кислой фосфатазы и кислой протеиназы между субмитохондриальными фракциями свидетельствуют также о том, что внутриклеточные органоиды, содержащие эти ферменты, сравнительно устойчивы к механическим повреждениям, а ферментные белки прочно связаны с их структурами. Такой вывод можно сделать на основании приведенных выше результатов контрольного опыта, а также следующих данных.

1. При таком малошадящем методе получения гомогената, каким является использованное в наших опытах измельчение ткани в механическом гомогенизаторе, в котором тефлоновый поршень вращается со скоростью 1380 об./мин. и делает 7—8 вертикальных проходов в цилиндре, в растворимую цитоплазматическую фракцию переходит не более 7% кислой протеиназы и около 12% общей активности кислой фосфатазы исходного гомогената мозга.

2. В результате многократных и продолжительных во времени процедур получения субмитохондриальных фракций кислые гидролазы также почти не экстрагируются. В зоне первой, самой богатой растворимыми белками, выявлено не более 3—5% общей активности кислых гидролаз, содержащихся в исходной фракции неочищенных митохондрий.

3. Обработка субмитохондриальных фракций тритоном X-100 (конечная концентрация 0,1%) способствует переходу кислых гидролаз в растворимую форму, вследствие чего общая активность ферментов в этих фракциях повышается (табл. 3).

Иной характер носит распределение нейтральной протеиназы между субмитохондриальными фракциями (табл. 2). Около 55% общей активности фермента сосредоточено в одной из самых легких фракций, состоящей в основном из миэлина (фракция А), и 20% — в зоне II, содержащей частицы, близкие по своим седиментационным свойствам к структурам фракции А. Каждая

Таблица 3

Прирост общей активности ферментов в субмитохондриальных фракциях ткани головного мозга кролика после обработки их тритоном X-100 (в %)

Фракции	Кислая фосфатаза	Кислая протеиназа	Нейтральная протеиназа
Митохондрии неочищенные	141	41	нет
Зона I	59	60	"
Фракция A	125	47	"
Зона II	168	70	"
Зона III	143	55	"
Фракция B	167	38	"
Зона IV	85	0	"
Фракция C	98	24	"

из остальных субмитохондриальных фракций содержит от 5 до 12% общей активности фермента. Удельная активность нейтральной протеиназы также самая высокая в фракции A и в зоне II.

Такое разное распределение кислой и нейтральной протеиназ в субмитохондриальных фракциях может рассматриваться как одно из доказательств в пользу наличия в ткани мозга двух различных протеолитических систем, локализованных в разных внутриклеточных структурах. Одна из них, активная в кислой среде, сосредоточена в тяжелых субклеточных структурах — лизосомах; вторая, с оптимумом pH в нейтральной зоне, локализована преимущественно в легких структурах нервной ткани (миэлин).

Нейтральная протеиназа, как и кислые гидролазы, не является растворимым цитоплазматическим ферментом. Она связана с внутриклеточными структурами. Об этом свидетельствует низкая общая и удельная активность этого фермента в зоне I, содержащей преимущественно растворимые белки (табл. 2), а также полученные нами данные о полном переходе этого фермента в осадок после центрифугирования фракций A, B и C (разбавленных до 0,32 М сахарозы) при 75000 g в течение 120 мин.

Однако в противоположность кислым гидролазам, нейтральная протеиназа связана со структурами менее прочно, легко освобождается из них и поэтому полностью определяется в субмитохондриальных фракциях. Общая активность нейтральной протеиназы в этих фракциях не повышается после обработки их тритоном X-100 (табл. 3).

Изложенные выше данные по химическому составу, электронномикроскопической картине и ферментативным свойствам выделенных субмитохондриальных фракций свидетельствуют о содержании в них различных внутриклеточных структур, выпол-



няющих в клетке разные функции. В связи с этим можно было полагать, что интенсивность обновления белка в этих структурах также будет неодинаковой.

Проведенные исследования показали, что белки субмитохондриальных фракций головного мозга кошки резко отличаются между собой по интенсивности обновления (табл. 4). Самая низкая удельная радиоактивность белка оказалась в фракции А. Белки субмитохондриальных фракций В и С обмениваются соответственно в 1,5 и 2,0 раза интенсивнее. Радиоактивность белков всех промежуточных зон находится на уровне таковой белков фракции В.

Таблица 4

Удельная радиоактивность белков субмитохондриальных и микросомной фракций ткани головного мозга кошки через 2,5 часа после подкожного введения метионина  $S^{35}$  ( $M + m$ ;  $n = 5$ )

Фракции	Удельная радиоактивность (имп./мин./мг белка)
Фракция А	$39 \pm 3,6$
" В	$58 \pm 6,4$
" С	$72 \pm 7,1$
Зона I      ) осадок ) надосадочная	$60 \pm 4,9$
" II	$106 \pm 1,7$
" III	$63 \pm 6,3$
" IV	$61 \pm 5,3$
Микросомы	$61 \pm 4,1$
	$119 \pm 8,1$

Такая низкая обмениваемость белка в фракции А обусловлена, вероятно, тем, что локализованные в ней миелиновые структуры содержат большое количество протеолипидов с очень низкой интенсивностью обновления. Представляют интерес данные о том, что белки фракции С обладают сравнительно высокой интенсивностью обновления; она лишь на 40% ниже таковой микросомных белков. Вероятно, прежнее представление о низкой обмениваемости митохондриальных белков, не согласовывавшееся с активной ролью этих органоидов в клеточном метаболизме, может быть отброшено.

Самой высокой удельной радиоактивностью среди белков субмитохондриальных фракций обладают белки I промежуточной зоны. Их обмениваемость находится на уровне обмениваемости микросомных белков. Однако высокий уровень радиоактивности в белках этой зоны не обусловлен примесью микросом. Об этом свидетельствуют следующие данные. Зона I была раз-

делена центрифугированием (105000 g, 60 мин.) на осадок, содержащий микросомы и возможные примеси других структур, а также надосадочную, состоящую из растворимых белков. Оказалось, что растворимые белки этой зоны обмениваются интенсивнее белков осадка (табл. 4). Следовательно, интенсивно обменивающиеся белки зоны I не являются микросомными, хотя близки к ним по своей метаболической активности. По-видимому, в этой зоне содержатся как растворимые белки цитоплазмы, так и быстро обменивающиеся растворимые белки митохондриального происхождения.

В каждой из основных субмитохондриальных фракций (А, В и С) также содержатся белки с весьма различной интенсивностью обновления. При обработке указанных фракций дезоксихолатом натрия (конечная концентрация 0,5%) и последующем их разделении центрифугированием (75000 g, 90 мин.) на осадок и надосадочную было показано, что растворимые в дезоксихолате натрия белки каждой фракции обмениваются интенсивнее нерастворимых белков этой же фракции (табл. 5). Причем соот-

Таблица 5

Удельная радиоактивность растворимых и нерастворимых в дезоксихолате натрия белков основных субмитохондриальных фракций ткани головного мозга кошки через 2,5 часа после подкожного введения метионина  $S^{35}$  ( $M \pm m$ ;  $n = 5$ )

Фракции	Удельная радиоактивность (имп./мин./мг белка)		У. А. надосадочн.
	Осадок	Надосадочная	У. А. осадка
А	$13,0 \pm 1,8$	$46,0 \pm 4,1$	$3,8 \pm 0,3$
В	$29,0 \pm 1,8$	$55,0 \pm 6,0$	$1,9 \pm 0,2$
С	$54,0 \pm 0,4$	$71,0 \pm 6,2$	$1,3 \pm 0,1$

ношение скоростей обмена между растворимыми и нерастворимыми белками в этих фракциях различно. Так, если в фракции А уровень радиоактивной метки в растворимых белках более чем в три раза превышает таковой белков осадка, а в фракции В — в два раза, то в фракции С это превышение составляет всего около 30%.

Полученные данные свидетельствуют о большой морфологической и биохимической неоднородности внутриклеточных структур, составляющих так называемую митохондриальную фракцию ткани головного мозга при выделении ее из гомогената методом дифференциального центрифугирования, а также о выраженной обменной гетерогенности белков субмитохондриальных фракций, обусловленной различной функциональной ролью самих структур и их белковых фракций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lajtha A., Furst S., Waelsch H., *Experientia*, **13**, 168, 1957.
2. Waelsch H., *Metabolism of the Nervous System*, Pergamon Press, Edit. D. Richter, p. 431, 1957.
3. Палладин А. В., Белик Я. В., Крачко Л. С., *ДАН СССР*, **127**, 702, 1959.
4. Толюшис Л., *Биохимия*, **28**, 161, 1963.
5. Roodyn D. B., Reis P. J., Work T. S., *Biochem. J.*, **80**, 9, 1961.
6. Truman D. E. S., Korner A., *Biochem. J.*, **85**, 154, 1962.
7. Kroon A. M., *Biochim. et biophys. acta*, **76**, 165, 1963.
8. Kalf G. F., Grece M. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 674, 1964.
9. Рудаков В. В., *Успехи совр. биол.*, **61**, 32, 1966.
10. Finean J. B., Hawthorne J. N., Patterson J. D. E., *J. Neurochem.*, **1**, 256, 1957.
11. Furst S., Lajtha A., Waelsch H., *J. Neurochem.*, **2**, 216, 1958.
12. Davison A. N., *Biochem. J.*, **78**, 272, 1961.
13. Gaitonde M. K., *Biochem. J.*, **80**, 277, 1961.
14. Whittaker V. P., *Biochem. J.*, **72**, 694, 1959.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
16. Цанев Р. Г., Марков Г. Г., *Биохимия*, **25**, 151, 1960.
17. Броун Р. Г., Гончарова В. П., *Укр. біохім. журн.*, **34**, 734, 1962.
18. Гончарова В. П., Броун Р. Г., *Укр. біохім. журн.*, **36**, 126, 1964.
19. Kun E., Abood L. G., *Nature*, **109**, 144, 1949.
20. Nordmann Jo, Nordmann R., Gauchery M. O., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1826, 1951.
21. Flexner J. B., Flexner L. B., *J. Cell. Comp. Physiol.*, **31**, 311, 1948.
22. Anson M. L., *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79, 1938.
23. Веремеенко К. Н., *Укр. біохім. журн.*, **35**, 294, 1963.
24. Gilboe D. D., Williams I. N., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **91**, 535, 1956.
25. Белик Я. В., Крачко Л. С., *Укр. біохім. журн.*, **30**, 322, 1959.

---

Выражаем благодарность заведующему лабораторией электронной микроскопии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, доктору биол. наук Я. А. Винникову и заведующему лабораторией электронной микроскопии Института экспериментальной и клинической онкологии Министерства здравоохранения УССР, кандидату мед. наук В. Г. Пинчуку за проведение электронномикроскопических исследований.



## О РАЗДЕЛЕНИИ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. РОЛЬ РАЗНЫХ ФРАКЦИЙ В АММИАКООБРАЗОВАНИИ

Е. Э. Клейн и Э. Г. Курцхалия \*

Институт физиологии АН Груз. ССР, Тбилиси

Изучение механизма аммиакообразования представляет интерес главным образом вследствие того, что этот процесс — очень тонкий и универсальный индикатор состояния возбуждения, т. е. деятельности всякой живой ткани. Следовательно его изучение может служить путем проникновения в химический механизм возбуждения. Мы изучаем аммиакообразование в головном мозгу. Уже стало известно, какие вещества и какие превращения принимают в нем участие, известны отдельные этапы его. Однако механизм процесса в целом и функциональный смысл его пока неясен.

Наименее изученным компонентом этой системы (или систем) процессов являются белки. Они включаются в процесс аммиакообразования преимущественно своими свободными амидными группами. Меняется их амидированность. Хотя никто из биохимиков не предполагал, что амидированность всех белков, образующих сложные системы в головном мозгу, может меняться одинаковым образом, до сих пор, говоря об их участии в аммиакообразовании, употребляют собирательный термин «белки мозга». Какие именно белки и каким путем они участвуют в аммиакообразовании — остается неизвестным. А между тем выяснение роли отдельных белков могло бы дать многое для понимания смысла процесса.

Но для этого прежде всего нужно научиться разделять всю сложную систему белков мозга на отдельные компоненты, а затем проследить участие этих компонентов в аммиакообразовании. Задача детального разделения белков мозга сама по себе сложна и пока не разрешена, хотя ею занимались уже многие исследователи, главным образом по отношению к растворимым

---

\* В работе использованы также материалы, полученные Г. С. Иорданишвили, Е. Г. Гоциридзе и Г. В. Гвалия.

белкам. В последние годы наиболее успешных результатов добились Палладин (1, 2), Бейли и Хелд (3), Мур (4). За разрешение второй половины задачи — изучение изменений амидированности разных белковых фракций при изменениях физиологического состояния, брались немногие авторы. Такого рода работы предпринимались Мартинсоном и Тяхепыльдом (5), Тяхепыльдом (6), Бейли и Хелд (7), Сухомлиновым с сотр. (8). Все они касаются только водорастворимых белков. Результаты их будут сопоставлены с нашими.

Мы в последние годы также занимались этой проблемой, используя разные способы разделения белков и исследуя изменения их амидированности под влиянием разного рода воздействий, стимулирующих освобождение аммиака. Был сделан ряд наблюдений, часть которых уже публиковалась (9—14), а часть являются новыми.

Настоящее сообщение представляет попытку обобщить все эти наблюдения. Вначале будет сказано о примененных методах разделения белков и способах аммиакообразующего воздействия, а затем будут показаны изменения амидированности разных белковых фракций в условиях этих воздействий.

Прежде всего мы разделяли белки по принадлежности к разным субклеточным структурам, т. е. прибегали к дифференциальному центрифугированию. Эти данные уже публиковались (13). Выделялись фракции: ядерная, митохондриальная и надосадочная жидкость, содержащая микросомы. Исследовались изменения их белкового амидного азота.

Затем было произведено выделение и исследование изменений амидированности белков, растворимых в водносолевых (т. е. буферных) растворах («белки р. в. с. р.»), а также в подкисленных органических растворителях («белки р. п. о. р.»). Белки, растворимые в буферах (Рингер-Кребса, трисе, медианоловом, фосфатном — в разных работах применялись разные буфера, но это не вносит существенных изменений), исследовались электрофоретически. Электрофоретическому разделению подвергались и экстракты из субклеточных фракций. Эти материалы сообщались на конференции (12) и частично переданы для публикации (14). Электрофорез проводился на бумаге и на агаре. Разделение белков этими двумя способами, конечно, несколько различается, но сопоставление возможно.

В упомянутых работах электрофоретические фракции обозначались номерами. Но т. к. сравнение результатов разных способов при таком обозначении становится затруднительным и может создать путаницу, в настоящем сообщении электрофоретические фракции или группы фракций будут обозначаться терминами, принятыми для фракций сыворотки («преальбуминовая», «альбуминовая» и « $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -глобулиновые») и являющимися близкими по положению к исследуемым фракциям белков мозга (но не

всегда вполне совпадающими с ними). Нужно помнить, что кроме положения на фореграмме эти названия ничего не указывают. При толковании изменений положения электрофоретических фракций мы исходили из допущения, что эти изменения вызываются, главным образом, изменениями амидирования белков.

Был использован еще один способ разделения белков р. в. с. р., именно разделение в тонком слое сефадекса. О нем нужно сказать несколько слов (этот материал еще не публиковался). Было применено двумерное разделение — сочетание электрофореза и гельфилтрации. Известно, что гельфилтрация разделяет вещества по молекулярному весу и, применяя для этой цели сефадекс, можно с известным приближением (на 90%) определить молекулярный вес фракций. Это и было сделано для экстракта белков мозга. Применялся сефадекс Г-200 тип фajn и суперфajn. Оказалось, что основное количество белков мозга имеет молекулярный вес от 40 000 до 50 000, и именно эти белки распадаются на ряд электрофоретических фракций (от «преальбумина» до ( $\gamma$ -глобулина»). Кроме этого, имеется фракция (электрофоретически на уровне,  $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов) с молекулярным весом около 200 000 и еще большая группа нечетко разграниченных мелких фракций примерно с той же электрофоретической подвижностью, составляющая ряд с молекулярным весом от 40 000 до 200 000 (рис. 1, 2).

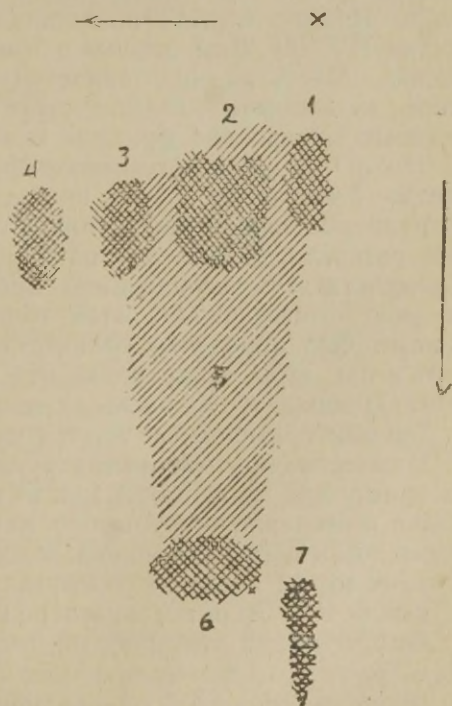


Рис. 1. Схема распределения фракций растворимых белков головного мозга при их двумерном разделении в тонком слое сефадекса Г-200 (тип фajn). В вертикальном направлении гельфилтрация в течение 4 часов, затем электрофорез в горизонтальном направлении тоже в течение 4 часов. Буфер: фосфатный, 0,02 М, содержащий NaCl 0,05 М, pH 7,0.

x — место нанесения; 1—4 фракции с молекулярным весом от 40 000 до 50 000: 1 — « $\gamma$ -глобулиновая»; 2 — « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая»; 3 — «альбуминовая»; 4 — «преальбуминовая»; 5 — нефракционирующаяся с молекулярным весом от 40 000 до 200 000; 6 — « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая» фракция с молекулярным весом 200 000; 7 — примесь микросом.



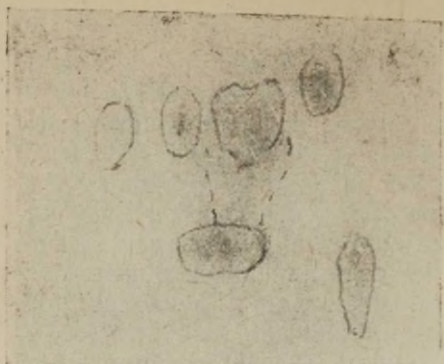


Рис. 2. Натуральная картина распределения фракций белков, изо-браженных схематически на рис. 1.

Следовательно этим способом было получено более детальное разделение, чем при бумажном и агаровом электрофорезе и выявлены изменения молекулярного веса белков при изучавшемся воздействии (инкубации). Об этом будет сказано ниже.

Наконец, о белках, растворимых в подкисленных органических растворителях («белки р. п. о. р.»), нужно сказать более подробно (этот материал также еще не опубликован). Хотя о существовании таких белков было давно известно (15), в головном мозгу они были обнаружены недавно (16). Там их найдено около 18% от общего количества. Изучен их аминокислотный состав (17, 18). Есть данные о том, что эти белки весьма разнообразны. Часть из них является также водорастворимыми, а часть, по-видимому, служит структурными единицами мембран, главным образом во фракции тяжелых микросом (19).

Но об их роли в аммиакообразовании ничего не было известно. Участие их в этом процессе было обнаружено работой сотрудников нашей лаборатории случайно, при выяснении причин разногласий результатов их работ по выделению липидов с результатами исследований Врба (21). Оказалось, что Врба не учел существования этой группы белков. Нашими сотрудниками был определен количественно их аминный и амидный азот и при этом обнаружено, что их амидные группы играют в аммиакообразовании очень активную роль.

Таковы примененные нами способы разделения белков.

В качестве приемов, активирующих аммиакообразование, были применены воздействия как *in vivo* — электрическое раздражение и введение конвульсанта камфоры, так и *in vitro* — инкубация гомогената. Изучалось также торможение аммиакообразования путем введения нембутала.

Все опыты были поставлены с головным мозгом крыс.

Полученные в этих работах результаты показали, что активность разных групп белков как образователей и устранителей аммиака неодинакова, одновременно активируются группы, об-

разующие аммиак (дезамидирующиеся) и устраняющие его (реамидирующиеся), и, наконец, что «активность» этих групп белков зависит от типа воздействия.

Обобщение и сопоставление данных, полученных этими методами, дало возможность составить некоторую общую схему участия разных групп белков в аммиакообразовании в головном мозгу. Она умышленно упрощена и, конечно, имеет еще много пробелов и неточностей, но, по нашему мнению, может служить ориентиром для дальнейшего изучения вопроса. Эта схема представлена на рис. 3. В последующем изложении она будет поясняться путем представления фактических данных, послуживших материалом для ее составления.

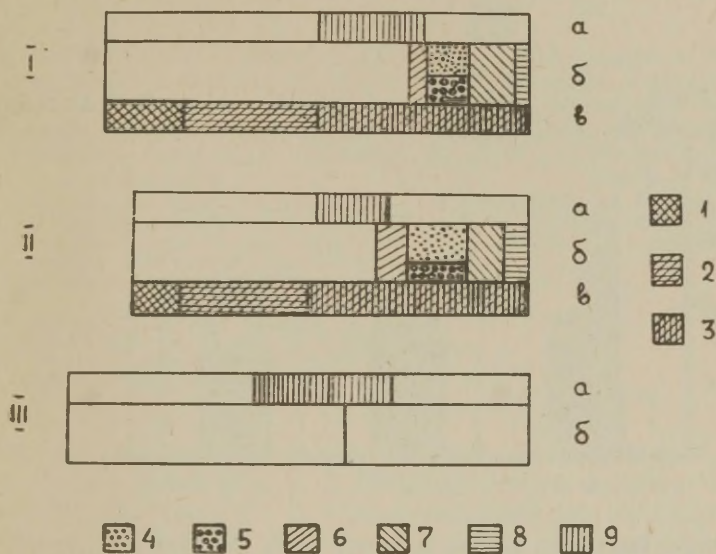


Рис. 3. Схематическое изображение изменений амидного азота разных фракций белков головного мозга (крысы) при воздействии, стимулирующих аммиакообразование и подавляющих его. Схема составлена на основании обобщения экспериментальных данных, представляемых в данном сообщении.

*I* — норма; *II* — аммиакообразование (электрическое раздражение, введение камфоры, инкубация гомогената); *III* — устранение аммиака (введение нембутала).

*а* — разделение белков по растворимости в подкисленных органических растворителях (незаштрихованная часть — нерастворимые в этих растворителях белки); *б* — разделение по растворимости в водносолевых растворах (буферах); разделение растворимых белков путем электрофореза и гельфильтрации (незаштрихованная часть — нерастворимые белки); *в* — разделение дифференциальным центрифугированием (амидный азот общих белков субклеточных фракций).

Субклеточные фракции: 1 — ядерная, 2 — митохондриальная, 3 — надосадочная жидкость.

Электрофоретические фракции: 4 —  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулиновая с  $M$  = от 40 000 до 200 000; 5 —  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулиновая, но с  $M$  = 40 000 — 50 000 (разделение на сефадексе); 6 —  $\gamma$ -глобулиновая; 7 — альбуминовая; 8 — преальбуминовая; 9 — белки, растворимые в подкисленных органических растворителях.

Исходными сведениями, вытекающими из наших прежних работ (9—11) и литературных данных (22), явились: 1) уменьшение суммарного амидного азота общих белков при аммиакообразующем воздействии, независимо от его вида (раздражение, инкубация); 2) растворимые белки (также суммарно) в то же время играют роль устранителей аммиака (амидируются).

В дальнейших исследованиях были получены следующие данные.

При аммиакообразовании в опытах с электрическим раздражением (13) происходит уменьшение запаса амидного азота белков ядерной фракции (рис. 4). Их амидированность падает с

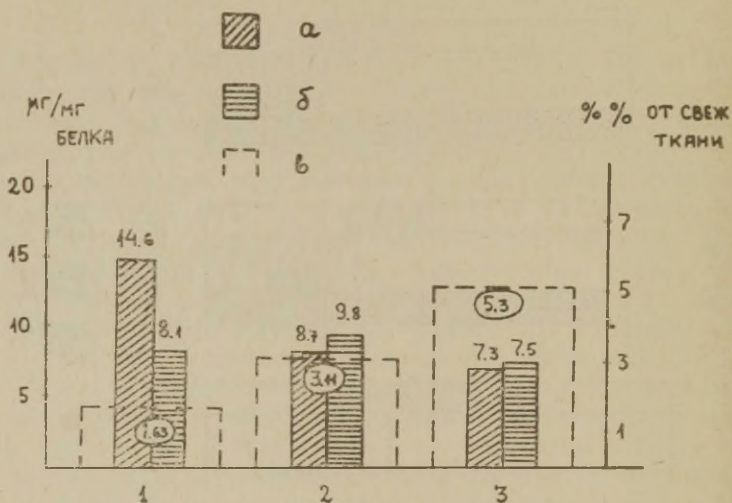


Рис. 4. Изменения общего амидного азота белков в субклеточных фракциях головного мозга крыс после электрического раздражения животных (μг/мг белка) и количество белка (в % от свежей ткани) в тех же субклеточных фракциях.

Раздражение производилось на электродной решетке током 60—100 в в течение 30 мин. а — норма; б — раздражение; в — количество белка в % от свежей ткани. 1 — ядерная фракция; 2 — митохондриальная; 3 — надосадочная жидкость.

14,6 до 8,1 мкг/мг белка. В двух остальных фракциях она даже немного растет: 8,7—9,8 и 7,3—7,5. Эти данные, правда, не говорят о том, какие это белки — структурные или цитоплазматические. Но сопоставление с упомянутым только что наблюдением о различной роли растворимых и нерастворимых (структурных) белков позволяет сделать допущение, что в данном случае аммиакообразователем являются скорее именно структурные (мембранные) белки ядерной фракции.



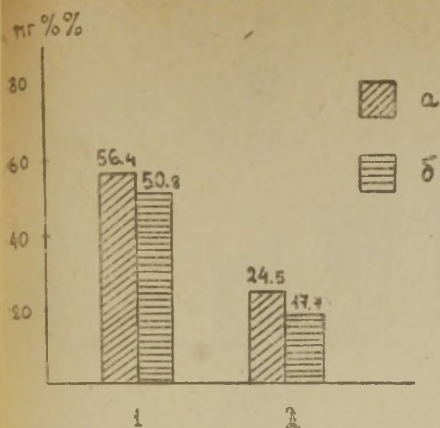


Рис. 5. Количественное изменение амидного азота белков головного мозга, растворимых в подкисленных органических растворителях (р. п. о. р.) под действием введения животным камфоры (судороги).

Примечание. Методика опытов была применена особая: камфора вводилась прижизненно, половина мозга служила контролем, вторая половина подвергалась инкубации, в ней продолжалось действие введенного вещества.

а — норма, б — введение камфоры. 1 — общий белок без белков р. п. о. р. (ТХУ — осадок, промытый подкисленными органическими растворителями); 2 — белки р. п. о. р.

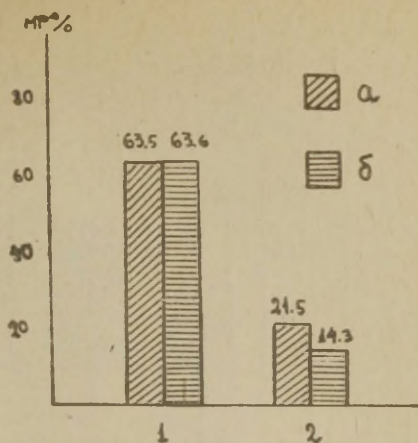


Рис. 6. Количественное изменение амидного азота белков головного мозга, растворимых в подкисленных органических растворителях (р. п. о. р.) при инкубации гомогената.

а — до инкубации; б — после инкубации. 1 — общий белок без белков р. п. о. р.; 2 — белки р. п. о. р.

Вторым аммиакообразователем при раздражающем воздействии служат белки р. п. о. р. Это выявляется в опытах с введением камфоры (рис. 5). В этих белках потеря амидного азота составляет 6,8 мг% (с 24,5 до 17,7 мг%), а в остальных белках — 5,6 мг% (с 56,4 до 50,8 мг%). Почти то же происходит в опытах с инкубацией гомогената. Но в последнем случае, казалось бы, вся потеря амидного азота падает на белки р. п. о. р. (рис. 6): амидированность этих белков уменьшается на 7,2 мг% (с 21,5 до 14,3 мг%), а остальных белков — не уменьшается (соответствующие цифры 63,5 и 63,6 мг%). Но, учитывая установленное ранее нарастание амидированности водорастворимых белков при аммиакообразующих воздействиях, нужно предположить дезамидирование примерно на ту же величину структурных белков (возможно, опять-таки ядерных).

Затрата этих двух групп белков отражена на общей схеме (рис. 3).

Электрофоретические исследования водорастворимых белков (белков р. в. с. р.) показали (12, 14), что, видимо, и среди этой группы имеются белки с аммиакообразующей функцией,

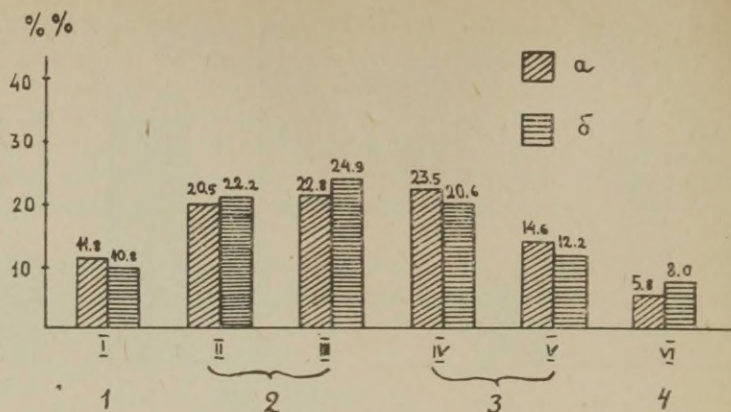


Рис. 7. Количественные изменения электрофоретических фракций белков головного мозга после электрического раздражения животных (величины фракций в %% от общего количества белка). Электрофорез на бумаге в веронал-мединаловом буфере, в теч. 8 час.

a — норма; б — раздражение. I — IV — прежние обозначения фракций (в опубликованной работе). 1—4 — обозначения по фракциям сыворок, имеющим близкую электрофоретическую подвижность (см. текст): 1 — « $\gamma$ -глобулиновая» фракция, 2 — « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая», 3 — «альбуминовая», 4 — преальбуминовая». Р везде  $< 0.05$  — изменения достоверны.

хотя при суммарном их исследовании, как только что было сказано, они регистрируются как устранители аммиака.

В этих работах проводились наблюдения над изменением количественного содержания электрофоретических фракций под воздействием электрического раздражения животных (электрофорез при этом проводился на бумаге) и при инкубации гомогената мозга (электрофорез на агаре и двумерное разделение на сефадексе). Полученные данные, представленные на рис. 7, 8 и 9, показывают, что при аммиакообразовании во всех трех случаях среди растворимых белков происходит увеличение более амидированных групп, т. е. «глобулиновых» фракций (« $\gamma$ -глобулиновой» + « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновой») за счет уменьшения «альбуминовой» фракции (изменение, отражающее роль этих белков в устранении аммиака). Здесь можно отметить интересную деталь, свидетельствующую о различном действии разных видов стимуляции аммиакообразования: в случае электрического раздражения (рис. 7) « $\gamma$ -глобулиновая» фракция несколько уменьшается (с 11,8 до 10,8%), в то время как после инкубации (рис. 8), наоборот, она резко увеличивается (с 18,8 до 22,2%).

С другой стороны, при электрическом раздражении (рис. 7) и при инкубации (рис. 9) обнаруживается тенденция увеличения

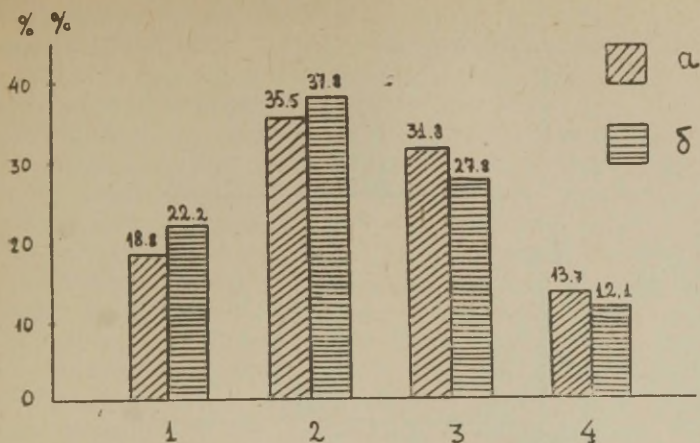


Рис. 8. Количественные изменения электрофоретических фракций белков головного мозга после инкубации гомогената.

Электрофорез на агаре в веронал-мединаловом буфере.

а — без инкубации; б — после инкубации. 1 — « $\gamma$ -глобулиновая» фракция,  $P < 0,01$ ; 2 — « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая» фракция,  $P < 0,3$ ; 3 — «альбуминовая» фракция,  $P < 0,05$ ; 4 — «преальбуминовая» фракция,  $P < 0,5$ . Достоверны изменения « $\gamma$ -глобулиновой» и «альбуминовой» фракций.

«преальбуминовой» фракции (соответственно с 5,8 до 8,0% и с 9,3 до 11,6%); на рис. 8 эта фракция уменьшается, но недостоверно. Истолковать этот факт можно, как нам кажется, только как свидетельство дезамидирования какой-то (количественно незначительной) части растворимых белков.

Эти изменения электрофоретических фракций также отражены на схеме (рис. 3).

Следует дополнительно упомянуть, что сообщаемые здесь изменения электрофоретических фракций при инкубации гомогената обнаруживаются только при инкубации цельного гомогената. При отдельной же инкубации субклеточных фракций изменения малодостоверны, т. е. менее выражены (14). Очевидно, при этом происходит нарушение процесса обмена амидных групп белков.

Попутно нужно отметить, что «преальбуминовая» фракция (в которой, если верны наши выводы, концентрируются аммиакообразователи из группы растворимых белков) имеет ряд интересных свойств. Она является специфичной для белков мозга (в других тканях нет белков с таким отрицательным зарядом) и наиболее обособлена при всяких способах деления. Ею заинтересовался Мур, применивший сложный и весьма совершенный способ деления (4). Он нашел, что входящие в нее



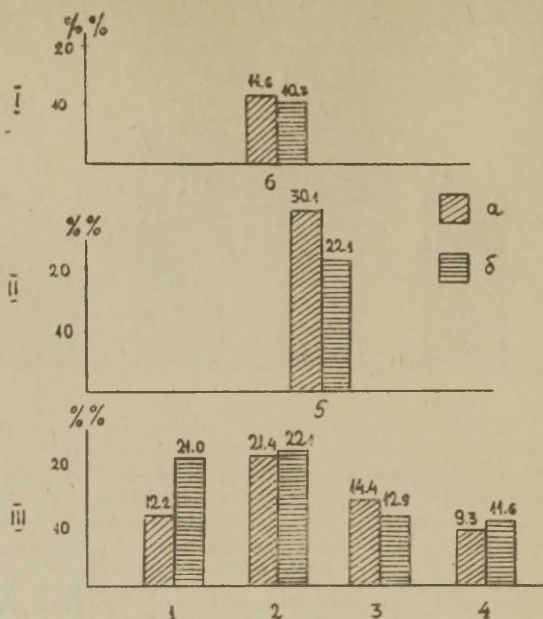


Рис. 9. Количественное изменение фракций белков головного мозга после инкубации гомогената. Двумерное разделение в тонком слое сефадекса Г-200.

Условия опыта см. подпись к рис. 1. *a* — норма, *b* — инкубация. 1–6 фракции белков: фракции с  $M = 40\,000 - 50\,000$ : 1 — « $\gamma$ -глобулиновая», 2 — « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая», 3 — «альбуминовая», 4 — «преальбуминовая», 5 — «нефракционирующиеся» белки с  $M = \text{от } 40\,000 \text{ до } 200\,000$  (на электрофоретическом уровне « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов» — «альбуминов»), и « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулиновая» фракция с  $M = 200\,000$ . Величина  $P$ : 1.  $< 0,001$ ; 2.  $< 0,5$ ; 3  $< 0,5$ ; 4.  $< 0,05$ ; 5.  $< 0,001$ ; 6.  $< 0,5$ . Следовательно изменения белков, « $\gamma$ -глобулиновых» и «нефракционирующихся» высокостойковы, а «преальбуминовых» — малодостоверны. Молекулярные веса фракций: I — 200 000, II — от 40 000 до 200 900, III — от 40 000 до 50 000.

белки отличаются высоким содержанием дикарбоновых аминокислот.

Далее представляет интерес сравнение наших наблюдений об изменениях электрофоретических фракций растворимых белков в связи с аммиакообразованием с немногими работами аналогичного характера, имеющимися в настоящее время в литературе. Заключение авторов всех этих работ совершенно различны. Так, Бейли и Хелд (7) не обнаружили никакой закономерности в количественных изменениях электрофоретических фракций

белков головного мозга (электрофорез на крахмале) при разнообразных воздействиях: электрошок, метразол, нембутал. Мартинсон и Тяхепыльд (5) и Тяхепыльд (6) заметили только сдвиг всей электрофоретической кривой белков мозга к катоду (электрофорез на бумаге) при введении животным хлористого аммония, т. е. отражение процесса устранения аммиака всеми растворимыми белками головного мозга. Это только в некоторой степени согласуется с нашими данными. Условия опыта, конечно, слишком различны. Но в работе Сухомлинова и Форняк (8) при алкогольной интоксикации крыс наблюдались изменения электрофоретических фракций белков мозга (электрофорез на агаре), весьма сходные с наблюдаемыми нами: уменьшение «альбуминовой» и « $\gamma$ -глобулиновой» фракций и увеличение « $\alpha$ -глобулиновой». Только в отличие от наших данных у них «преальбуминовая» фракция не увеличивалась, а уменьшалась. Но нужно учесть, что характер раздражения был иным. В работе с мышечными белками (23) был получен почти сходный результат: при утомлении мышц увеличивалась также глобулиновая фракция (отражение процесса устранения аммиака), но не за счет « $\alpha$ », « $\beta$ -глобулиновой», а только « $\gamma$ -глобулиновой» фракции.

Следовательно, в отношении изменения амидированности, т. е. заряда, растворимые белки представляют сложную картину, зависящую от разных условий опыта. На рис. 3 эти процессы представлены упрощенно.

Далее наши опыты с разделением на сефадексе показали, что перестройка белков при аммиакообразовании (вызванном инкубацией гомогената) не сводится только к изменению их амидированности (которая меняет в свою очередь электрофоретическую подвижность), но при этом происходит и изменение величины молекул.

Данные, представленные на рис. 9, показывают, что происходит достоверное уменьшение количества «нефракционирующихся» белков (с 30,1% до 22,1%), т. е. группы белков с широким диапазоном изменчивости молекулярного веса от 40 000 до 200 000 (на рис. 1 и 2 они представляют собой широкую диффузную полосу).

Так как увеличения более крупных фракций с молекулярным весом 200 000, по-видимому, не происходит (в наших опытах достоверного изменения не обнаружено), то, следовательно, количество «нефракционирующихся» белков уменьшается за счет увеличения белков мелких фракций: достоверно увеличиваются « $\gamma$ -глобулиновая» (с 12,2 до 21,0%) и «преальбуминовая» (с 9,3 до 11,6%) фракции с молекулярным весом 40 000—50 000. Это приводит к заключению, что имеется тенденция к уменьшению величины белковых молекул, т. е. возможный распад на субъединицы.

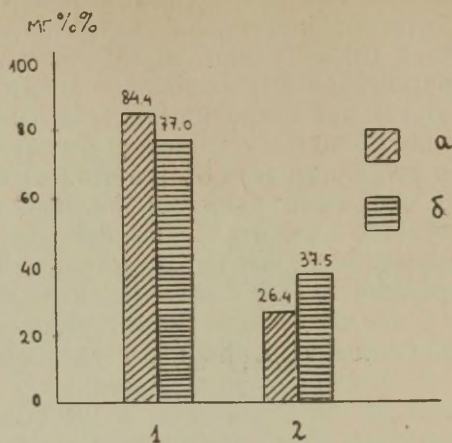


Рис. 10. Изменение амидного азота белков головного мозга, растворимых в подкисленных органических растворителях (р. п. о. р.) под действием введения животным нембутала (сон).  
Примечание. Методика была применена такая же, как и в случае испытания действия камфоры — см. примечание к рис. 5.

а — норма, б — введение нембутала  
1 — общий белок без белков р. п. о. р. (ТХУ — осадок, промытый подкисленным органическим растворителем); 2 — белки р. п. о. р.

Нужно сказать, что «недифференцирующиеся» белки по своей электрофоретической подвижности находятся на уровне « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов-альбуминов». Это заставляет нас сделать следующее сопоставление с ранее полученными результатами агаровых фореграмм (12, 14): изучение этих фореграмм показало их большую индивидуальную изменчивость именно в области « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов». Возможно, что это связано с вышеупомянутой перестройкой белковых молекул по величине.

При исследовании воздействия противоположно направленного фактора — нембутала, который, как ранее было установлено (11), вызывает нарастание суммарного амидного азота белков, настоящие опыты показали следующее. Оказалось (рис. 10), что это нарастание происходит в основном за счет белков р. п. о. р., количество их амидного азота увеличивается с 26,4 до 37,5 мг%. Это показывает их большую лабильность — они служат либо активными аммиакообразователями при раздражающем воздействии (рис. 5 и 6), либо устранителями, в зависимости от условий. Среди остальных белков (рис. 10) происходит



потеря амидного азота (с 84,4 до 77,0 мг%). Очевидно при действии нембутала дезамидируются опять-таки какие-то структурные белки (а растворимые — амидируются).

Четких изменений электрофоретических фракций в данном случае не было обнаружено, поэтому здесь эти цифры не приводятся. (На рис. 3 также приведено лишь общее увеличение амидного азота растворимых белков и белков р. п. о. р.).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены группы белков со специфической активностью в процессе аммиакообразования. В этом отношении представляет интерес роль мембранных белков (ядерной фракции, а также микросомальной — куда относятся белки р. п. о. р.). В более детальном разделении и изучении нуждаются также растворимые белки мозга.

### Заключение

Обобщение данных исследования изменений амидного азота разных групп белков головного мозга при разного рода воздействиях (стимулирующих аммиакообразование и подавляющих его) *in vivo* и *in vitro* показало, что участие этих белков в обмене аммиака различно.

Имеются группы белков, являющиеся аммиакообразователями. Таковы белки «ядерной» фракции (по соображениям, изложенным в тексте, скорее всего это структурные белки данной фракции). Затем активными аммиакообразователями служат белки, растворимые в подкисленных органических растворителях — малоизученная группа белков, входящая в основном в структурные единицы мембран микросомальной фракции. Аммиакообразователем служит еще группа растворимых белков из «альбуминовой» фракции, которая после дезамидирования обнаруживается в «преальбуминовой» фракции. Эта фракция является специфичной для белков мозга.

Протекающий при этом одновременный процесс устранения аммиака осуществляется главным образом растворимыми белками, попадающими во фракцию « $\alpha$ ,  $\beta$ -глобулинов» (по-видимому, тоже из «альбуминовой» фракции).

При подавлении аммиакообразования активным устранителем его являются белки, растворимые в подкисленных органических растворителях (возможно, другая их часть), а также какая-то (неустановленная) группа водорастворимых белков.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., III Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 9, 1963.
2. Полякова Н. М., III Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 25, 1963.

3. Bailey B. F. S., Heald P. J., J. Neurochem., 6, 342, 1961.
4. Moor B. W., McGregor D., J. Biol. Chem., 240, 1647, 1965.
5. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Биохимия, 26, 989, 1961.
6. Тяхепыльд Л. Я., Ученые записки Тартуского ун-та, вып. 134, стр. 189, 1963. Цит. по Р. Н. Ф., 879, 1964.
7. Bailey B. F. S., Heald P. J., J. Neurochem., 7, 81, 1961.
8. Сухомлинов Б. Ф., Форняк Н. М., Укр. биох. журн., 37, 322, 1965.
9. Клейн Е. Э., Труды Ин-та физиол. АН ГССР, 12, 153, 1961.
10. Клейн Е. Э., Труды Ин-та физиол. АН ГССР, 13, 173, 1963.
11. Клейн Е. Э., Иорданишвили Г. С., Гвалия Н. В., III Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 193, 1963.
12. Клейн Е. Э., I Всесоюзн. биох. съезд, Тезисы, вып. II, стр. 128, Ленинград, 1964.
13. Клейн Е. Э., Гвалия Н. В., Вопр. биохимии нервной и мышечной систем, Тбилиси, 73, 1965.
14. Клейн Е. Э., Гвалия Н. В., Курцхалия Э. Г., ДАН СССР — в печати.
15. Lewin S., Arch. Biochem. and Biophys., 50, 515, 1954.
16. Otsuki S., Geiger A., J. Neurochem., 10, 415, 1963.
17. Michael E. E., Biochem. J., 82, 212, 1962.
18. Gaitonde M. K., J. Neurochem., 8, 234, 1961.
19. Munro H. N., Downy E. D., Arch. Biochem. and Biophys., 106, 515, 1964.
20. Кометиани П. А., Укр. биох. журн., 37, 721, 1965.
21. Vrba R., Folbergrova J., J. Neurochem., 4, 338, 1959.
22. Гершеневич Э. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина А. И., III Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 91, 1963.
23. Boggio Gilot G., Med. Sperim., 36, 307, 1959.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОДНОГО ИЗ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

С. А. Кудинов, Н. М. Полякова

Институт биохимии АН Укр. ССР, Киев

Наличие белков основного характера в нервной ткани было показано в нашей лаборатории в 1956 году методом электрофореза на бумаге (1). С помощью электрофореза в крахмальном геле Бейли и Хелд нашли в цитоплазматических растворимых белках мозга 5—6 электрофоретических зон,двигающихся к катоду (2). Хонегер этим же методом обнаружил разницу в электрофоретических зонах основных белков серого и белого вещества больших полушарий (3).

Имеются также данные, касающиеся возможной физиологической роли основных белков в нервной ткани. Томсон и Мак-Ильвейн, изучая особенность срезов коры мозга в среде с глюкозой отвечать на раздражение электрическим током повышенным потреблением кислорода, обнаружили способность гистонов тормозить этот процесс (4). Кис и др. выделили из мозга морской свинки белок основного характера, который обладал способностью при введении его животным вызывать экспериментальный аллергический энцефаломиелит (5). Белок из мозга, выделенный по методу Киса и др., обладал также способностью стимулировать синтез белка в клетках лимфатических узлов, в то время как поли-L-лизин тормозил включение меченого лейцина в белки на 90% (6).

Данные, касающиеся основных белков других органов, довольно обширны. Из литературы известно, что основные белки играют важную роль в биологических процессах: они принимают участие в регуляции синтеза нуклеиновых кислот и белков (6, 7, 8), могут влиять на скорость ферментативных реакций (8, 9) и на проницаемость клеточных мембран (8, 10), тормозить рост злокачественных опухолей (8, 11) и т. д.

Изучение растворимых белков головного мозга, проведенное в нашей лаборатории, показало, что при электрофорезе в агар-агаровом геле белки разделяются на 16 электрофоретических зон



(12). Белки 14, 15 и 16-ой зон при граничном электрофорезе в веронал-мединаловом буфере (рН 8,6) двигаются к катоду, что говорит об основном характере белков этих зон.

В данной работе приводятся результаты по выделению, очистке и изучению некоторых свойств белка 15-ой электрофоретической зоны.

### Материал и методы

Исходным материалом для получения и очистки белка 15-ой электрофоретической зоны были большие полушария головного мозга крупного рогатого скота.

Электрофорез на агар-агар геле (размер стеклянных пластинок  $18 \times 4$  см, толщина агарового слоя 2,5—3,5 мм) проводили в веронал-мединаловом буфере рН 8,6; ионная сила — 0,0125; напряжение — 110 в; продолжительность — 7 часов (13).

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Разделение проводили на колонках размером  $12 \times 3,6$  и  $40 \times 1,3$  см, заполненных ДЭАЭ-целлюлозой с ёмкостью 0,47 миллиэквивалентов. Белок с ДЭАЭ-целлюлозы элюировали водой.

Хроматография на сефадексе Г-100. Разделение проводили на колонке  $190 \times 1,1$  см в 0,1 М NaCl. Скорость элюции 9,6 мл/час. Собирали фракции по 3,2 мл.

Содержание белка определяли биуретовым методом, несколько измененным в нашей лаборатории для нервной ткани (14) или методом Лоури (15).

Граничный электрофорез проводили в приборе для микроэлектрофореза типа Антвейлера, изготовленном в экспериментально-конструкторской мастерской Института физиологии им. А. А. Богомольца. Электрофорез проводили с 1% раствором белка в веронал-мединаловом буфере рН 8,6; ионная сила — 0,1; напряжение — 70 в; сила тока — 1,8 мА; продолжительность — 18 мин.

Седиментацию белка проводили в ультрацентрифуге типа Г-100 венгерского завода МОМ. Использовался 0,8% раствор белка в 0,1 М растворе хлористого натрия. Скорость 50 000 об/мин.

Количественный аминокислотный анализ гидролизатов белка проводили на автоматическом анализаторе аминокислот (Бекман-Спинко, модель 120 В, смола — амберлиг 1R-120) по методу Мура и др. (16). Гидролиз проводили в течение 22, 46 и 70 часов.

Для определения амидного азота навеску белка (7—10 мг) растворяли в 1 мл 1 N серной кислоты и в пробирках с притертыми пробками погружали в кипящую водяную баню на 2 часа. По окончании гидролиза белок осаждали добавлением 0,25 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Осадок промывали бидистиллированной водой. Надосадочную жидкость объединяли с промывной водой и использовали для определения амидного аммиака. Аммиак определяли микродиффузионным методом Браун, Дуда и др. (17) в модификации А. И. Силаковой (18).

### Результаты опытов и их обсуждение

#### I. Очистка 15-ой электрофоретической фракции.

Экстракция. Большие полушария головного мозга крупного рогатого скота, перфузированные через сонные артерии охлажденным физиологическим раствором, на льду доставляли в

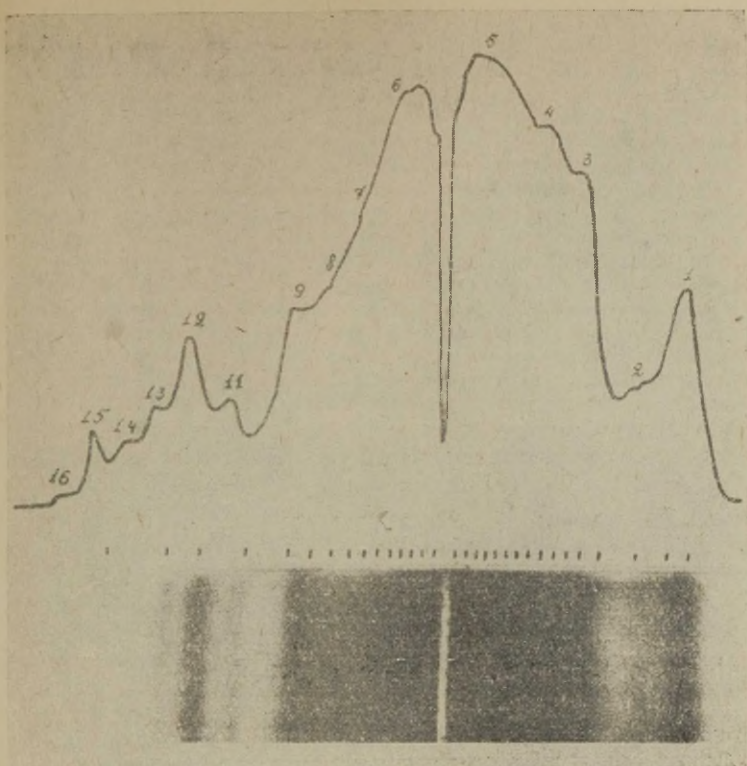


Рис. 1. Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков водного экстракта ткани головного мозга.

лабораторию, очищали от оболочек, гомогенизировали в дистиллированной воде в соотношении 1:2 и оставляли при 4°С на протяжении 12 часов. Для получения экстракта гомогенат центрифугировали 20 мин. при 50 000 g. На рис. 1 приведены электрофореграмма и денситометрическая кривая белков этого экстракта мозга.

Фракционирование сернокислым аммонием. К водному экстракту мозга добавляли сухую соль сернокислого аммония до 0,7 насыщения, оставляли на 2—3 часа и центрифугировали при 45 000 g в течение 15 мин. Осадок белка после центрифугирования отбрасывали, а к надосадочной жидкости добавляли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до полного насыщения, оставляли на ночь и центрифугировали 15 мин. при 45 000 g. Осадок растворяли в дистиллированной воде и диализировали при 4°С против воды до полного устранения сульфата аммония. При этом много бел.

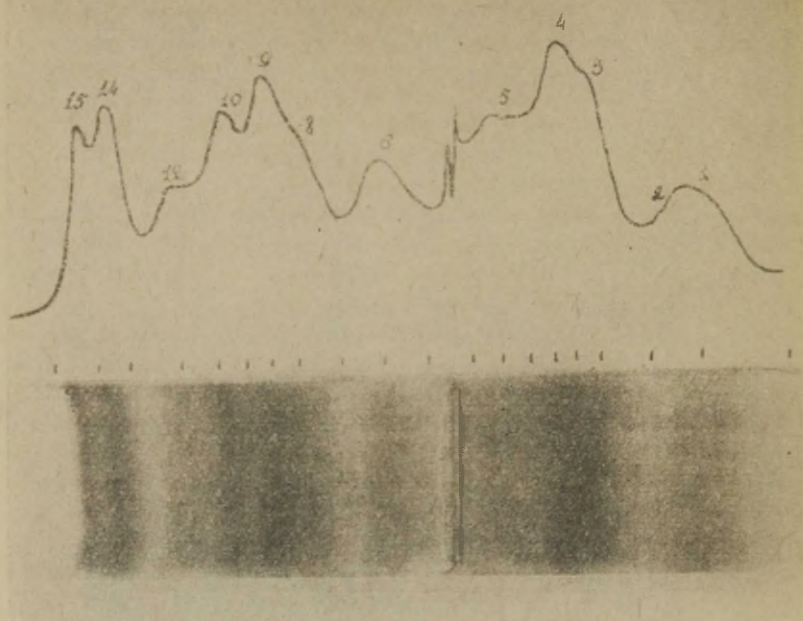


Рис. 2. Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков, осажденных сернистым аммонием от 0,7 до полного насыщения.

ков, не выдерживавших диализа против воды, выпадали в осадок и их после центрифугирования отбрасывали. Небольшую часть надосадочной жидкости лиофилизировали и подвергали электрофорезу на агар-агаре. Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков, полученных после высаливания, приведены на рис. 2. Остальную часть раствора белка хроматографировали на ДЭАЭ-целлюлозе.

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Белковый раствор вносили в колонку размером  $12 \times 3,6$  см, заполненную ДЭАЭ-целлюлозой, стабилизированной боратным буфером pH 8,3 и ионной силой 0,005. Белок из колонки элюировали дистиллированной водой. Элюат собирали в один сосуд, концентрировали его в холодильнике с помощью вентилятора и после диализа лиофилизировали. Электрофореграмма белка после этой стадии очистки приведена на рис. 3.

Повторная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. В колонку ( $40 \times 1,3$  см), заполненную ДЭАЭ-целлюлозой, стабилизированной боратным буфером pH 8,3 и ионной силой 0,005, вводили 40—50 мг белка, растворенного в 2 мл этого



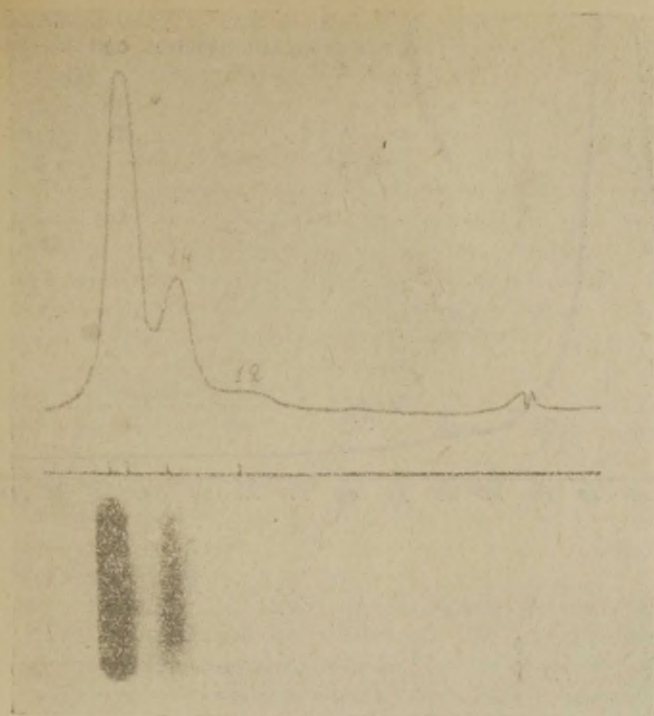


Рис. 3. Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков, элюированных дистиллированной водой с ДЭАЭ-целлюлозы (размер колонки  $12 \times 3,6$  см).

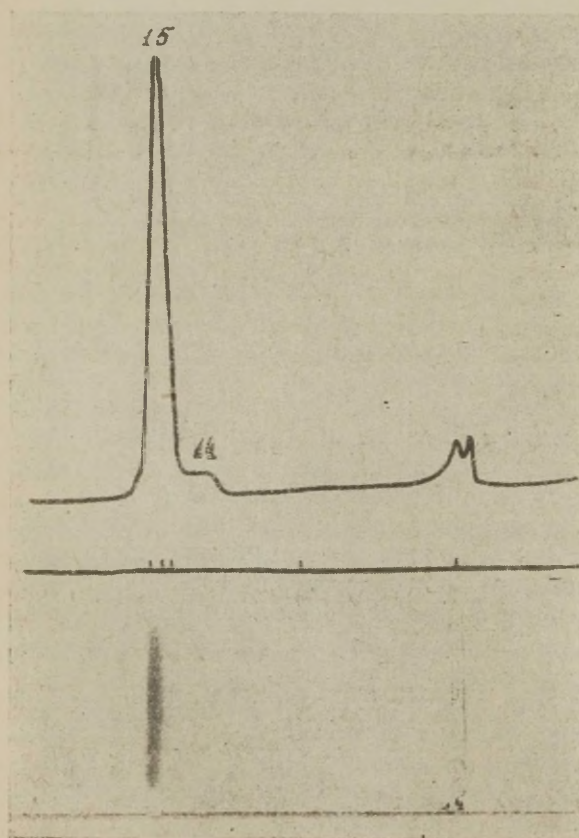
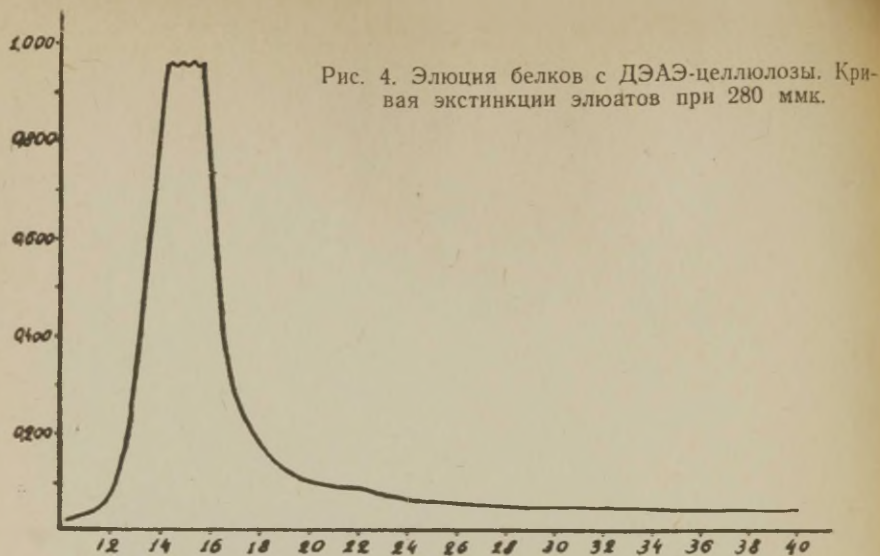
же буфера. Раствор белка до введения его в колонку центрифугировали, так как небольшая часть белка не растворялась в буфере. Элюцию белков из колонки проводили дистиллированной водой со скоростью 18 мл/час. Элюаты объемом 3 мл собирали с помощью автоматического коллектора фракций. За ходом элюции следили по светопоглощению элюатов при 280 мкм.

На рис. 4 приведена кривая экстинкции элюатов при 280 мкм.

Элюаты, отвечавшие пику на кривой, соединяли, диализировали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков, элюированных дистиллированной водой из ДЭАЭ-целлюлозы, приведены на рис. 5.

Хроматография на сефадексе Г-100. Высушенный белок растворяли в минимальном количестве (2 мл) 0,1 М NaCl, центрифугировали и наносили на колонку ( $190 \times 1,1$  см), заполненную сефадексом Г-100. Элюцию проводили 0,1 М раствором хлористого натрия со скоростью 9,6 мл/час.



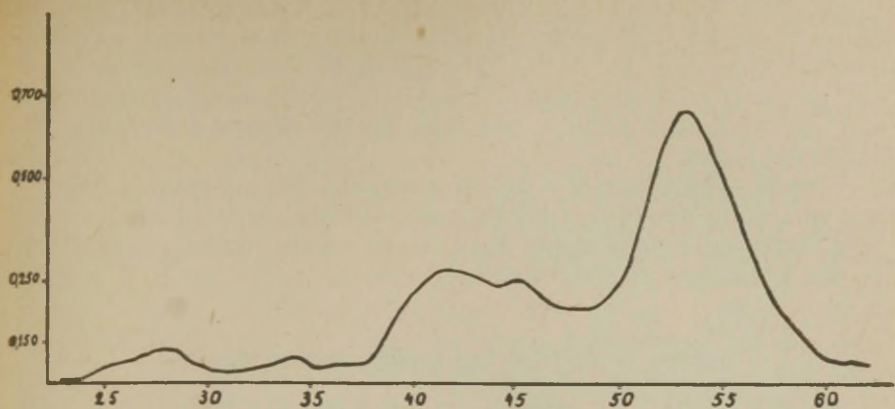


Рис. 6. Элюция белков с сефадекса Г-100. Кривая экстинкции элюатов при 280 мμ.

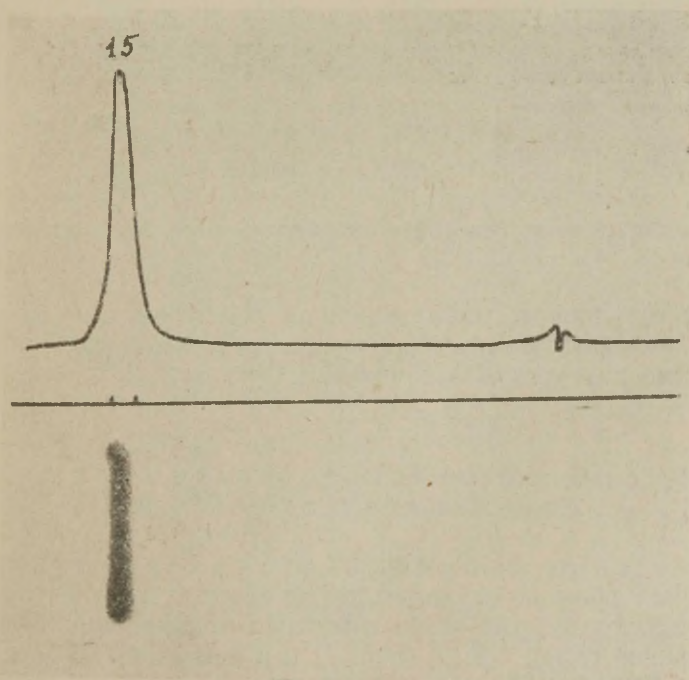


Рис. 7. Электрофореграмма и денситометрическая кривая белков, элюированных 0,1 М раствором NaCl с сефадекса Г-100.



Элюаты объемом 3,2 мл собирали с помощью автоматического коллектора фракций. На рис. 6 приведена кривая экстинкции элюатов при 280 мкм. Раствор из пробирок, которые соответствуют пику 15 на кривой (рис. 6), соединяли, диализировали против дистиллированной воды, концентрировали и высушивали лиофилизацией.

Электрофореграмма и денситометрическая кривая белка, полученного на этой стадии очистки, приведены на рис. 7.

В таблице 1 приведены результаты одного из опытов очистки белка 15-ой электрофоретической фракции.

Таблица 1

**Очистка белка 15-ой электрофоретической фракции**

Стадии очистки	Объем фракции в мл	Концентрация белка в мг/мл	Общее количество белка в мг	Выход белка в %
Гомогенат мозга	5200	34,5	179400	—
Экстракт	2600	7,2	18720	100 *
Фракционирование с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,7—1,0 насыщения)	150	19,5	2920	15,6
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	230	0,57	143	0,77
Повторная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	24	2,2	52	0,28
Хроматография на сефадексе Г-100	50	0,4	20	0,11

\* За 100% принято количество всех белков, содержащихся в экстракте.

Для визуального наблюдения за ходом очистки белка проводили электрофорез на агаровом геле белковых фракций, получаемых на разных стадиях очистки (рис. 1, 2, 3, 5, 7).

## II. Исследование гомогенности белка и его аминокислотного состава.

Гомогенность очищенного белка 15-ой электрофоретической фракции изучали прежде всего путем электрофореза. Электрофорез на агар-агаре в веронал-мединаловом буфере pH 8,6 и ионной силой 0,0125 (рис. 7) и в ацетатном буфере pH 5,0 (ионная сила 0,0125) показал, что исследуемый нами белок давал на электрофореграмме одну полосу, то есть был электрофоретически гомогенным.

Электрофоретическое исследование 1% раствора белка в приборе для микроэлектрофореза выявило один симметричный пик, что также свидетельствовало о его гомогенности.

Далее для проверки гомогенности белка проводили рехроматографию его на ДЭАЭ-целлюлозе и на сефадексе Г-100. В обоих случаях белок элюировался одним симметричным пиком.

Исследование 0,8% раствора белка в 0,1 М NaCl в ультрацентрифуге на протяжении 2 часов при 50 000 об/мин выявило также один симметричный пик, что подтвердило гомогенность полученного нами белка.

Таким образом, вышеуказанные процедуры очистки 15-ой электрофоретической фракции привели к получению белка, который был гомогенным при исследовании его граничным электрофорезом и электрофорезом на агар-агаре, рехроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и сефадексе Г-100 и в ультрацентрифуге.

Количественное определение аминокислотного состава белка. Проведенные анализы позволили количественно определить в гидролизатах белка семнадцать аминокислот. Данные этих анализов приведены в таблице 2. В

Таблица 2

Аминокислотный состав белка 15-ой электрофоретической фракции

Аминокислоты	мкМ аминокислот			Среднее *	г аминокислот 100 г белка
	мг белка				
	Время гидролиза				
	22 ч.	46 ч.	70 ч.		
Лизин	0,72	0,71	0,71	0,71	10,38
Гистидин	0,21	0,20	0,21	0,21	3,26
Аммиак	1,06	1,15	1,24	0,99	1,68
Аргинин	0,35	0,34	0,34	0,34	5,92
Аспарагиновая кислота	0,77	0,76	0,77	0,77	10,25
Треонин	0,40	0,38	0,38	0,41	4,88
Серин	0,45	0,43	0,42	0,46	4,83
Глутаминовая кислота	0,83	0,81	0,82	0,82	12,06
Пролин	0,52	0,53	0,53	0,53	6,10
Глицин	0,68	0,66	0,68	0,67	5,03
Аланин	0,47	0,44	0,46	0,46	4,10
Цистеин	0,08	0,07	0,07	0,08	0,97
Валин	0,58	0,59	0,62	0,60	7,03
Метионин	0,09	0,09	0,09	0,09	1,34
Изолейцин	0,32	0,31	0,32	0,32	4,20
Лейцин	0,78	0,76	0,77	0,77	10,10
Тирозин	0,27	0,25	0,25	0,28	5,07
Фенилаланин	0,20	0,20	0,20	0,20	3,30

\* Для треонина, серина, тирозина и аммиака взяты величины, полученные при экстраполировании к нулевому времени гидролиза.

последних двух колонок таблицы приведено содержание треонина, серина, тирозина и аммиака, определенное при экстраполировании к нулевому времени гидролиза; для других аминокислот взяты средние величины.

Анализ выявил большое количество аспарагиновой и глютаминовой кислот, причем сумма этих аминокислот больше суммарного количества лизина, гистидина и аргинина, в то время как по своему поведению белок основной. Это противоречие можно объяснить, если предположить, что определенная часть дикарбоновых аминокислот образовалась при гидролизе из глютамина и аспарагина. Это предположение оправдано тем, что анализ выявил большое количество аммиака.

Для решения этого вопроса в белке был определен амидный аммиак. Он составляет 0,74 мкМ, т. е. 74,7% от количества выявленного аммиака. Таким образом, около половины суммарного количества аспарагиновой и глютаминовой аминокислот, выявленного анализом, находится в белке в виде амидов.

Отношение суммарного количества основных аминокислот к суммарному количеству дикарбоновых аминокислот, имеющих свободную карбоксильную группу, составляет величину 1,49, чем и объясняется основной характер белка. Из основных аминокислот наибольшее количество приходится на долю лизина.

В белке содержится много лейцина, валина и пролина, т. е. аминокислот, несущих лиофобные группы. Если аспарагиновую и глютаминовую кислоты, лизин, серин и треонин отнести к полярным аминокислотам, а валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин и фенилаланин — к неполярным, как это делает Ф. Хэтч (19), то отношение первой группы ко второй составит величину 1,27.

Анализ обнаруживает очень малое содержание серусодержащих аминокислот. В случае цистеина, очевидно, имеет место значительная ошибка. Это связано с низкой чувствительностью нингидриновой реакции на цистеин и с разрушением цистеина при гидролизе. Количество триптофана в исследуемом белке не определялось.

Из основных белков наиболее хорошо изучены белки ядерных рибосом и гистоны. Сравнивая их аминокислотный состав с таковым исследуемого нами белка, можно прийти к заключению о значительном их различии. Гистоны тимуса содержат по сравнению с ним в два раза больше аргинина и аланина, но не содержат цистеина. Существенны отличия и в содержании глицина (20, 21). От ядерных рибосомальных основных белков исследуемый белок отличается меньшим содержанием аргинина (почти в два раза) и фенилаланина (в полтора раза), а также тем, что содержит цистеин (22).

Метаболически активный основной белок, выделенный из ядерной растворимой белковой фракции, содержит почти такое



же количество основных аминокислот, как и наш белок, и имеет почти такую же величину отношения основных аминокислот к кислым (23). Отличается он по содержанию ОН-содержащих аминокислот, цистеина, глицина, аланина и фенилаланина.

Исследуемый белок по аминокислотному составу довольно близок к выделенному из мозга основному белку, который обладает способностью вызывать у животных экспериментальный аллергический энцефаломиелит и стимулирует синтез белка в клетках лимфатических узлов *in vitro* (6). Значительное отличие наблюдается только в содержании глютаминовой кислоты и аланина. Этот энцефалогенный белок, однако, не экстрагируется, если мозг предварительно не обработан хлороформ-метанольной смесью (24), а если и обработан, то экстрагируется при pH ниже 5-и (3), что существенно отличается от условий выделения нашего белка.

### Выводы

1. С помощью высаливания сульфатом аммония, хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и сефадексе Г-100 из больших полушарий головного мозга крупного рогатого скота выделен и очищен белок 15-ой электрофоретической фракции.

2. Гомогенность очищенного белка была показана при граничном электрофорезе и при электрофорезе на агар-агаровом геле, при рехроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе и сефадексе Г-100, а также в ультрацентрифуге.

3. На автоматическом анализаторе аминокислот количественно определено содержание в белке 17 аминокислот.

4. Аминокислотный анализ, а также движение белка к катоду при граничном электрофорезе (pH 8,6) указывают на основной характер исследуемого белка.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Полякова Н. М., ДАН, **109**, 1174, 1956.
2. Bailey B. F. S., Heald P. I., J. Neurochem., **6**, 342, 1961.
3. Honegger C. C., Ann. N. Y. Acad. Sci., **122**, 199, 1965.
4. Thomson C. G., Mc Ilwain H., Biochem. J. **79**, 342, 1961.
5. Kies M. W., Murphy I. B., Alvord E. L., Fed. Proc. **19**, 207, 1960.
6. Kornguth S. E., Thompson N. G. Jr., Arch., Biochem. Biophys., **105**, 308, 1964.
7. Bartalos M., Nature, **109**, 1958, 1963.
8. Rzezycki W., Post. Biochem., **9**, 431, 1963.
9. Machinist I. M., Das M. L., Grane F. L., Jacobs E. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **6**, 475, 1962.
10. Rivenbark W. L., Hanson I. B., Biochem., Biophys. Res. Comm., **7**, 318, 1962.

11. Vorobyev V. I., Bresler V. M., *Nature*, **198**, 545, 1963.
12. Полякова Н. М., Лішко В. К., *Укр. біохім. журн.*, **34**, 10, 1962.
13. Палладіи О. В., Кудінов С. О., *Укр. біохім. журн.*, **36**, 548, 1964.
14. Палладіи А. В., Кирсенко О. В., *Биохимия*, **26**, 385, 1961.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. I., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
16. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H., *Analyt. Chem.*, **30**, 1185, 1958.
17. Brown R. H., Duda G. D., Rorkes S., Handler Ph., *Arch. Biochem. and Biophys.*, **66**, 301, 1957.
18. Силакова А. И., Труш Г. П., Явилякова А., *Вопр. мед. химии*, **8**, 538, 1962.
19. Hatch F. T., *Nature*, **206**, 777, 1965.
20. Phillips D. M. P., Johns E. W., *Biochem. J.*, **94**, 127, 1965.
21. Butler I. A. V., Cohn P., *Biochem. J.*, **37**, 330, 1963.
22. Wand T. Y., *Biochem. Biophys. Acta*, **87**, 141, 1964.
23. Wand T. Y., *Biochem. Biophys. Acta*, **114**, 620, 1966.
24. Laatch R. H., Kies M. W., Gordon S., Alvord E. C., *J. Exp. Med.*, **115**, 777, 1962.

## ВОДОРАСТВОРИМЫЕ БЕЛКИ НЕЙРОГИПОФИЗА И ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

А. А. Галоян, Ж. Г. Абелян

Институт биохимии АН Арм. ССР, Ереван

Гормонообразовательная функция элементов нейрогипофиза до настоящего времени берется под сомнение.

Ряд авторов полагает, что гормоны нейрогипофиза образуются питуицитами (1—4). Другие исключают секреторную функцию глиальных клеток нейрогипофиза — питуицитов (5—8). Некоторые авторы предполагают наличие специальных, отличных от глиальных клеток мозга питуицитов нейрогипофиза, обладающих секреторными свойствами (9). Большинство же авторов, на основании экспериментальных данных, предполагают, что роль питуицитов заключается в химическом отделении носителя от активного начала (идущих из гипоталамуса) и транспорте высвобождающихся активных начал в кровяное русло (10).

Чрезвычайная трудность решения этих вопросов породила ряд теорий о месте образования гормонов нейрогипофиза — вазопрессина и окситоцина. Имеются три теории о месте образования гормонов нейрогипофиза: 1) в базофильных клетках аденогипофиза; 2) в питуицитах нейрогипофиза; 3) в супраоптических и паравентрикулярных ядрах гипоталамуса.

Мы не задаемся целью дать все литературные данные в пользу той или иной теории. Отметим лишь то, что большинство авторов на основании морфо-биохимических данных (7), считают, что местом образования известных до сих пор нейрогипофизарных гормонов являются нейросекреторные ядра гипоталамуса. Нейрогипофизу же придается роль резервуара.

Вазопрессин и окситоцин в составе глюко-липо-протеидного комплекса транспортируются по нервным волокнам, а также гуморальным путем (через порталные сосуды) из супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса в нейрогипофиз и депонируются там.

В 1941 г. Ван Дейк из нейрогипофиза животных выделил



специфический белок, обладающий вазопрессорно-антидиуретическим и окситоически-лактогенным свойствами (11). Дальнейшие исследования ряда авторов показали, что октапептиды электростатическими силами адсорбированы на поверхности инертного белка — нейрофизина (12, 13).

При поисках новых биологически активных соединений нейрогипофиза важное значение имеет выяснение места образования белка-носителя. Нам не удалось выделить из гипоталамуса в составе водорастворимых белков белок Ван Дейка. Важно изучить отношение полипептидных гормонов к белкам-носителям по ходу транспорта этих веществ из гипоталамических ядер в нейрогипофиз. Поэтому представляет большой интерес изучение белкового состава нейрогипофиза и гипоталамуса в сравнительном аспекте. Такое направление исходит из наших прежних данных о том, что в 1961 г. нами были выделены из гипоталамо-нейрогипофизарной системы ряд новых биологически активных веществ, оказывающих регулирующее влияние на коронарное кровообращение (14). Некоторые из них суживали, а другие заметно расширяли коронарные сосуды.

В 1964 г. из гипоталамуса крупных животных А. Галояном был выделен также водорастворимый белок (на наш взгляд специфический), который полностью воспроизводит коронарорасширяющий эффект низкомолекулярных пептидов, выделенных из этой же части.

Учитывая то, что нами было показано наличие коронароактивных веществ в нейрогипофизе, можно было предположить и наличие коронароактивного белка в нейрогипофизе. В связи с этим мы задались целью изучить водорастворимые белки нейрогипофиза, их функциональное значение. При этом мы стремились сравнить функциональные и химические свойства белков гипоталамуса и нейрогипофиза с целью выяснения места их образования.

### Методика

Из свежих гипофизов свиней отделяли нейрогипофизы, тщательно очищали от крови и гомогенизировали дистиллированной водой в соотношении 1 : 2. Приготовленный гомогенат центрифугировали при 9000 об/мин в течение 20 мин. Из надосадочной жидкости путем высаливания серноокислым аммонием выделяли водорастворимые белки. Влияние белковых фракций на коронарное кровообращение изучали на кошках по методу Кавериной (15). Принцип этого метода заключается в измерении количества крови, оттекающей из венозных сосудов сердца в единицу времени. Кровяное давление измеряли манометрическим методом на *a. carotis communis*. Определение количества глюкозы до и после введения белковых фракций производили через 30 и 60 мин. по методу Дюмазер. Кровь брали из наружной яремной вены под нембуталовым наркозом из расчета 5 мг нембутала на 100 г веса. Количество гликогена определяли также через 30 и 60 мин. после введения белковых фракций антроновым методом Морриса (16).

## Результаты исследования

Нам удалось выделить 10 водорастворимых белковых фракций из нейрогипофиза быков и свиней. Важно было выяснить функциональное значение данных белков. Следует отметить, что почти такое же количество водорастворимых белковых фракций нами было выделено из гипоталамуса этих же животных. Учитывая то обстоятельство, что в нейрогипофизе исключается процесс образования гормонов, необходимо было выяснить идентичность белков нейрогипофиза с белками гипоталамуса. Важно также знать другие свойства нейрогипофизарных белков. Как известно, белок Ван Дейка обнаружен в нейрогипофизе. Многочисленные опыты с введением различных белковых фракций кошкам не выявили каких-либо свойств белка Ван Дейка. Эти опыты наводят на мысль, что, по-видимому, эти вещества в гипоталамусе и в нейрогипофизе связываются не с одним и тем же белком.

Наличие специфического коронароактивного белка в гипоталамусе, а также коронароактивных низкомолекулярных пептидов как в гипоталамусе, так и в нейрогипофизе послужило поводом к поиску коронароактивного белка также в нейрогипофизе. Опыты, проведенные вместе с нашим сотрудником Г. Геворкяном, показали, что после внутривенного введения лиофильного белкового порошка III белковой фракции из расчета 2 мг на кг

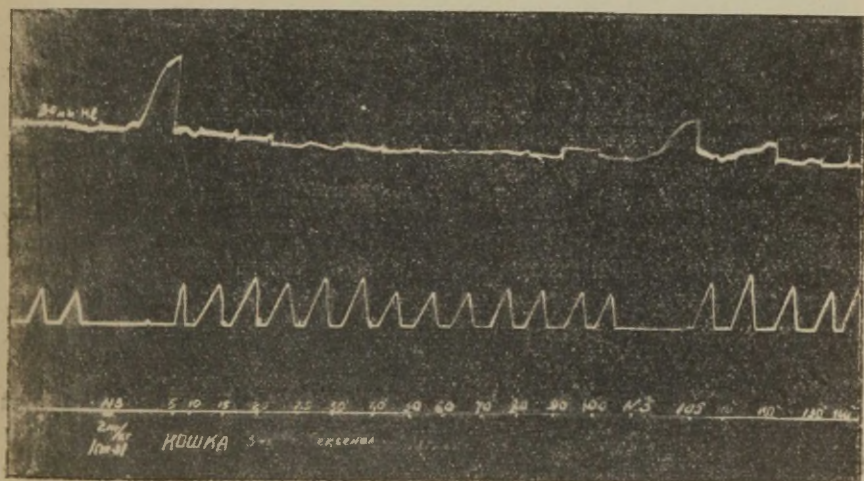


Рис. 1. Кривая изменения объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца:

Обозначения сверху вниз: 1 — кровяное давление; 2 — кривая объемной емкости крови, оттекающей из венозных сосудов сердца за единицу времени; 3 — отметки времени.



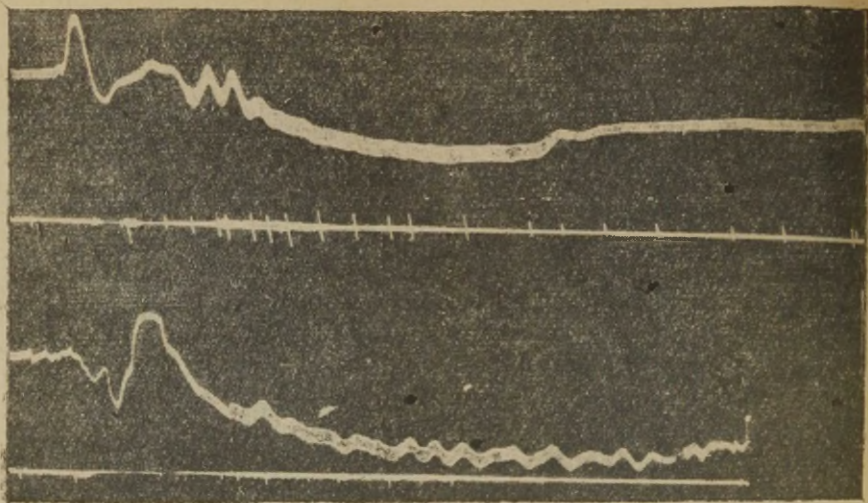


Рис. 2. Кривая изменения кровяного давления кошки под влиянием нейро-гипофизарного белка (фракция I).  
Сверху вниз: 1 — кровяное давление; 2 — дыхание.

веса кошки коронарные сосуды заметно расширяются. Как видно из рис. 1, после введения белка через 5 мин. заметно увеличивается количество крови, оттекающей из венозных сосудов сердца. Через 25—30 мин. количество крови достигает 70—80%, затем постепенно возвращается к норме (на 90 минуте). Повторное введение этого же белка из расчета 1 мг на кг веса воспроизводит коронарорасширяющий эффект. Этот эффект, как и при первичном введении, сравнительно короток. Как видно из этого же рисунка, сразу же после введения белка кровяное давление поднимается и через 2—3 минуты возвращается к первоначальному уровню. За весь период опыта в дальнейшем кровяное давление не изменяется. При повторном введении кровяное давление тоже кратковременно поднимается.

Следует подчеркнуть, что эффект нейрогипофизарного белка как по продолжительности, так и по величине кривой уступает гипоталамическому специфическому белку. Нейрогипофизарный белок, в отличие от гипоталамического, кратковременно поднимает кровяное давление в первые минуты. Можно полагать, что этот белок не гомогенный, а является смесью коронаро-активного белка с белком Ван Дейка. В настоящее время проводятся опыты по очистке и идентификации этого белка.

Опыты показали наличие и других функционально активных белков нейрогипофиза. Так, например, одна из этих фракций заметно понижает кровяное давление, причем после введения



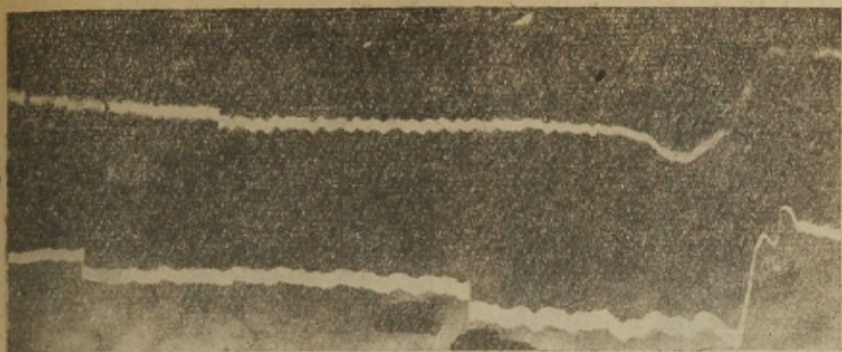


Рис. 3. Кривая изменения кровяного давления кошки под влиянием фракции II.

сразу же кровяное давление повышается, затем волнообразно понижается (рис. 2). Можно полагать, что и данный белок не является гомогенным. Другая фракция, наоборот, повышает кровяное давление (рис. 3). Но не исключена возможность, что в этих белках имеется и белок Ван Дейка.

Представляет большой интерес также выяснить метаболическую активность водорастворимых белков нейрогипофиза. Опыты ясно показали, что I белковая фракция после введения кошкам внутривенно через 30—60 мин. понижает количество глюкозы в крови на 30,5 мг% по сравнению с первоначальным уровнем. Если до введения количество глюкозы составляло 86,2 мг%, то через 30 и 60 мин. — соответственно 55,5 и 59 мг%. Это составляет 35,5%. II, III, IV и V фракции, наоборот, при введении таких же количеств белка повышают уровень глюкозы в крови. Наибольшую активность проявляет IV фракция. Если до введения количество глюкозы в крови составляло 85,6 мг%, то через 30 мин. после введения оно достигает в среднем 117 мг% (рис. 4). По сравнению с нормой количество глюкозы увеличивается на 31,4 мг%, что составляет 36,6%. Важно отметить, что, хотя все эти фракции повышают уровень глюкозы в крови, их эффекты не отличаются друг от друга. Так, например, II фракция имеет тенденцию повышать количество глюкозы в течение одного часа, а может и больше (хотя в меньшей степени, чем IV фракция). III фракция повышает содержание через 30 мин, а на 60 минуте имеет тенденцию понижать. IV и V фракции повышают уровень глюкозы только в течение 30 минут.

Другие белковые фракции (VI, VII, VIII, IX и X), по нашим данным, почти не оказывают влияния на уровень глюкозы в кро-

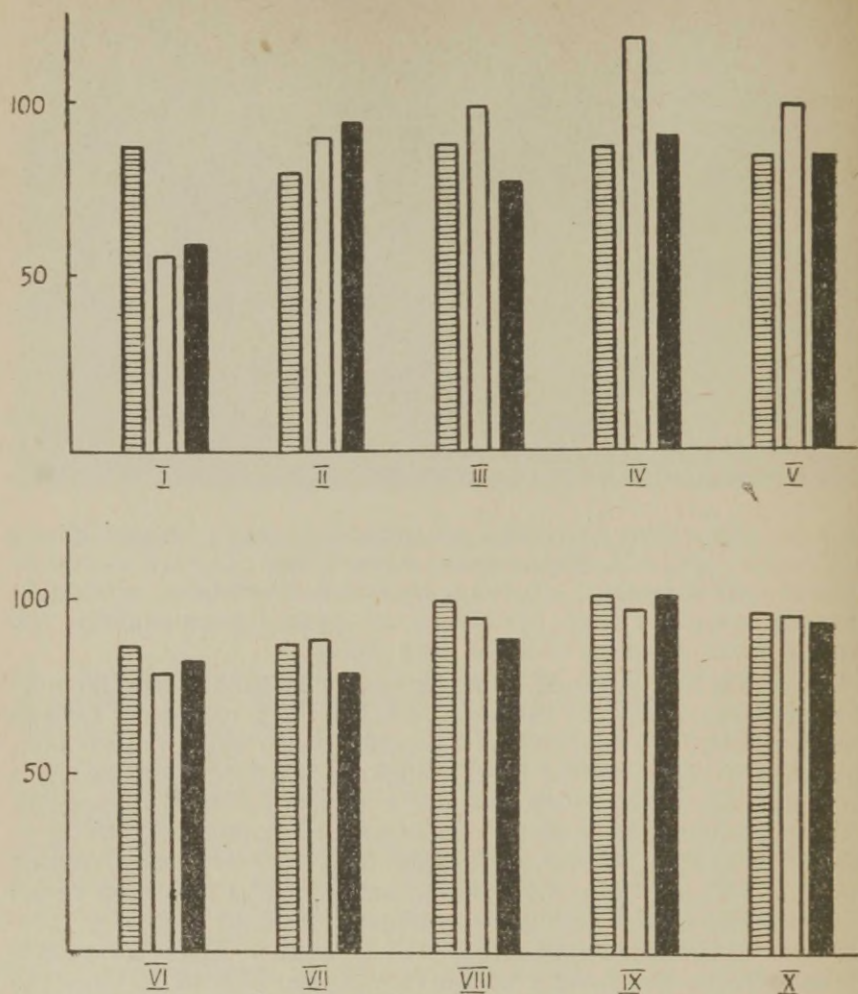


Рис. 4 и 5. Изменения количества глюкозы в крови под влиянием различных белковых фракций:

▨ — до введения белка; □ — через 30 минут после введения; ■ — через 60 минут после введения.

ви, за исключением фракции VIII, которая понижает уровень глюкозы. Таким образом, результаты наших исследований показывают, что в нейрогипофизе имеется ряд неидентифицированных, по-видимому специфических, функционально активных водорастворимых белков.

## Обсуждение результатов

Полученные нами данные расширяют представления о функции и гормональном составе нейрогипофиза. Обнаруженное нами наличие коронароактивного белка говорит в пользу гормонального значения этого специфического белка.

Представляет большой научный интерес выяснить механизмы выделения этих активных белков из нейрогипофиза в кровь, их место в регуляторных механизмах, а также другие их свойства. Наличие различных белков, оказывающих антагонистическое влияние на уровень глюкозы в крови, представляет особый интерес, так как до сих пор не выяснен вопрос о центральных нейрогуморальных механизмах регуляции углеводного обмена. Не исключено, что эти белки могут иметь непосредственное отношение к инсулярному аппарату, а также к катехоламинам. Предпринятые нами опыты выясняют эти вопросы. Для выяснения физиологического значения этих белков важное значение приобретает изучение влияния этих белков на уровень глюкозы в крови на фоне экспериментальных гипо- и гипергликемии, диабета и т. д., ибо регуляторные механизмы должны прежде всего проявляться при патологических состояниях. Глубокому морфобиохимическому и функциональному анализу подлежит вопрос о месте и роли питуицитов, а также неклочных образований в образовании этих белков.

## Выводы

1. Из нейрогипофиза быка и свиней выделены методом высаливания 10 водорастворимых белковых фракций.

2. В составе этих белков имеются:

- а) белок, повышающий кровяное давление;
- б) белок, понижающий кровяное давление;
- в) белок, обладающий коронарорасширяющим свойством;
- г) белок, повышающий уровень глюкозы в крови на 36,5%

по сравнению с нормой;

д) белок, понижающий уровень глюкозы в крови на 35%.

Результаты наших исследований показывают, что в нейрогипофизе имеется ряд неизвестных, по-видимому специфических, белковых фракций, играющих регуляторную роль в отношении ряда функций организма.

## ЛИТЕРАТУРА

- 1. De Lawder A. M., Tarr Z., Geiling F. M. H., J. Pharmacol., **51**, 14, 1934.
- 2. Ger sh J., Amer. J. Anat., **64**, 407, 1939.
- 3. Fischer C., Endocrinology, **2**, 19, 1937.



4. Ranson S. W., Fischer G., Ingram W. R., Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis., **17**, 410, 1938.
5. Bargmann W., Z. Zellforsch. u. Mikroskop. Anat., **34**, 610, 1943.
6. Bargmann W., Scharrer E., Amer. Scientist, **39**, 255, 1951.
7. Scharrer E., Scharrer B., Rec. Progr. in Horm. Res., **10**, 183, 1954.
8. Laveque T. F., Scharrer E., Endocrinology, **52**, 436, 1959.
9. Hild W., Texas Rep. Biol. Med., **188**, 474, 1954.
10. Thomas O. X., J. Comp. Neurol., **95**, 73, 1951.
11. Van Dyke H. B. et al., J. Pharmacol. Exptl. Therap., **74**, 190, 1942.
12. Block R. J., Van Dyke H. B., Arch. Biochem. Biophys., **36**, 14, 1952.
13. Acher A., Chauvet J., Oliverly G., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 421, 1956.
14. Галоян А. А., Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции Изд. «Айастан», Ереван, 1965.
15. Каверина Н. В., Фармакология и токсикология, **1**, 39, 1958.
16. Morris D. L., Science, **107**, 254, 1948.

## ИЗУЧЕНИЕ АМФ-ДЕЗАМИНАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Н. М. Полякова, М. К. Малышева

Институт биохимии АН Укр. ССР, Киев

Из многих процессов, ведущих к образованию аммиака в нервной ткани, нами был избран для исследования процесс деаминации адениловой кислоты.

В мозговой ткани адениловая кислота может освобождать аммиак либо после предварительного дефосфорилирования (1), либо непосредственно с помощью АМФ-деаминазы, активной в присутствии АТФ (2—5).

Интересной особенностью АМФ-деаминазы оказалась ее способность активироваться ионами натрия и калия. Немногочисленные исследования этого свойства относятся к ферменту эритроцитов (6, 7) и головного мозга (5, 8, 9). Полученные по этому вопросу данные еще недостаточны для того, чтобы оценить физиологическое значение активирования АМФ-деаминазы ионами натрия и калия. Однако уже теперь высказано предположение о возможном участии АМФ-деаминазы в ионном транспорте (10).

В настоящей работе нами изучалось влияние ионов натрия, калия и магния на активность АМФ-деаминазы субклеточных фракций головного мозга. В работе использованы методы, описанные в предыдущей статье (5).

Нашими предыдущими исследованиями (6) было показано, что АМФ-деаминаза распределяется в субклеточных фракциях головного мозга следующим образом: 45% активности сосредоточено в растворимой цитоплазматической фракции, 40% связано с митохондриальной, 10% — с микросомной и 5% — с ядерной фракциями.

Поскольку в этих исследованиях митохондриальная фракция получалась очень гетерогенной, мы попытались расфракционировать ее на отдельные компоненты. Мы воспользовались методом очистки митохондрий в градиенте плотности сахарозы. Унттейкера (11) в модификации Белика, Терлецкой и Смерчинской (труды настоящей конференции). Согласно этому методу, были

получены субфракции А, В, С и промежуточные зоны 1, 2, 3, 4. Фракцию А составляли в основном миелиновые фрагменты, фракцию В — синаптические везикулы и деформированные мембраны и фракцию С — митохондрии.

В таблице 1 приведены средние величины общей и удельной активности АМФ-деаминазы в различных митохондриальных субфракциях и промежуточных зонах.

Таблица 1

Активность АМФ-деаминазы в митохондриальных субфракциях

Митохондриальные субфракции и зоны	Удельная активность (мкг N-NH <sub>3</sub> на мг белка)	Общая активность (в процентах)
Грубая фракция митохондрий	15,4	100
А	16,2	26,9
В	10,1	12,0
С	19,3	18,0
1	40,2	24,7
2	10,8	10,5
3	14,3	4,3
4	7,3	3,6

Условия инкубации: 2,7 мМ АМФ; 1,8 мМ АТФ; 50 мМ NaCl; 50 мМ трис буфер, рН 7,2; 1—2 мг белка исследуемой фракции; 37°C, 30 мин.

Из таблицы можно видеть, что очищенные митохондрии содержат 18% общего количества фермента грубой митохондриальной фракции мозга. Много фермента в зоне I и во фракции А. Дополнительные исследования показали, что АМФ-деаминаза частично переходит в раствор при промывании митохондрией раствором сахарозы. Поэтому мы считаем, что зона I содержит в основном фермент, вымытый из митохондрий 0,32 М раствором сахарозы, и, кроме того, небольшое количество фермента растворимой цитоплазматической фракции.

Отмывание миелиновой фракции А приводит к большому снижению в ней ферментативной активности. Поэтому столь высокое содержание в этой фракции фермента объясняется, по-видимому, загрязнением ее зоной I.

В наших предыдущих исследованиях (5) было показано, что ионы натрия и калия сильно активируют АМФ-деаминазу различных субклеточных фракций головного мозга, причем установлено, что в структурных компонентах клетки активность фермента незначительна при отсутствии указанных ионов, а в растворимой цитоплазматической фракции она высока и при отсутствии добавок ионов.

В дополнение к этим исследованиям теперь показано, что диализ растворимой фракции, приводящий к удалению из нее ионов



натрия и калия, снижает активность фермента лишь на 15—18%. Добавление к диализированной растворимой фракции ионов натрия в количестве, эквивалентном ушедшему при диализе, полностью восстанавливает прежнюю активность АМФ-деаминазы.

Раньше нами не было обнаружено каких-либо значительных различий в активирующей способности ионов натрия и калия. Интересно было выяснить совместное влияние ионов натрия и калия на активность АМФ-деаминазы. В этой серии опытов в качестве источников фермента были использованы митохондрии и растворимый фермент митохондрий (зона 1). Результаты этих исследований представлены в таблице 2 (средние величины активности).

Таблица 2

Активность АМФ-деаминазы в присутствии различных концентраций ионов натрия и калия (мкг N-N<sub>3</sub> на 1 мг белка)

Ионы Концентрация мМ	Na <sup>+</sup>		K <sup>+</sup>		Na <sup>+</sup> и K <sup>+</sup>	
	20	130	20	130	20 + 130	130 + 20
Митохондрии	19,0	31,3	19,0	35,5	33,9	31,0
Растворимый фермент митохондрий	25,2	37,3	20,6	37,0	34,5	37,0

Условия опыта те же, что и к таблице 1.

Из таблицы видно, что при добавлении ионов натрия и калия в однозначных концентрациях фермент проявляет примерно одинаковую активность. Добавление ионов натрия или калия в небольших концентрациях к среде, содержащей противоположный ион в более высокой концентрации, не изменяет активности АМФ-деаминазы.

В следующей серии опытов изучалось влияние ионов магния при малых (20 мМ) и больших (130 мМ) концентрациях ионов натрия и калия на активность АМФ-деаминазы различных субклеточных фракций головного мозга.

Активность АМФ-деаминазы при добавлении ионов магния была одинакова и в присутствии натрия, и в присутствии калия. Поэтому в дальнейшем будут приведены данные по активности фермента на фоне натрия.

Известно, что митохондрии и микросомы мозга обладают АТФ-азной активностью, которая сильно повышается в присутствии ионов магния. При этом снижается концентрация активатора АМФ-деаминазы (АТФ) и возрастает концентрация неорганического фосфата, который оказывает тормозящее влияние на АМФ-деаминазу. Поэтому при изучении активности АМФ-деаминазы в присутствии ионов магния мы учитывали и активность АТФ-азы.

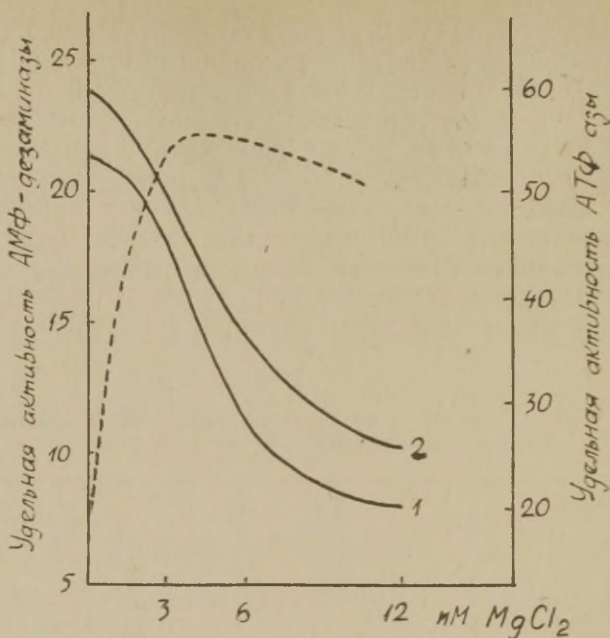


Рис. 1. Влияние ионов магния на активность АМФ-дезаминазы (сплошная линия) и АТФазы (пунктирная линия) митохондрий головного мозга. Условия инкубации: 5 мм АМФ; 4 мм АТФ; 20 мм (1) или 120 мм (2) NaCl; 50 мм трис буфера. pH 7.2; 1 мг белка митохондрий; 37°C, 30 мин.

На рис. 1 представлен график зависимости активности АМФ-дезаминазы и АТФазы митохондрий от различных концентраций ионов магния.

Из рисунка видно, что активность АМФ-дезаминазы снижается при повышении концентрации ионов магния. Активность АТФазы возрастает с повышением концентрации магния до 3 мм, а затем остается примерно на одном уровне при увеличении концентрации магния до 12 мм. Дополнительные исследования показали, что освобождающийся из АТФ неорганический фосфат при максимальной активности АТФазы снижает активность АМФ-дезаминазы на 20%. Этим, по-видимому, и объясняется снижение активности АМФ-дезаминазы при повышении концентрации магния до 3 мм. Дальнейшее снижение активности АМФ-дезаминазы вызывается, очевидно, другими причинами.

Из рис. 1 видно также, что натрий в больших концентрациях не влияет на степень торможения АМФ-дезаминазы ионами магния.

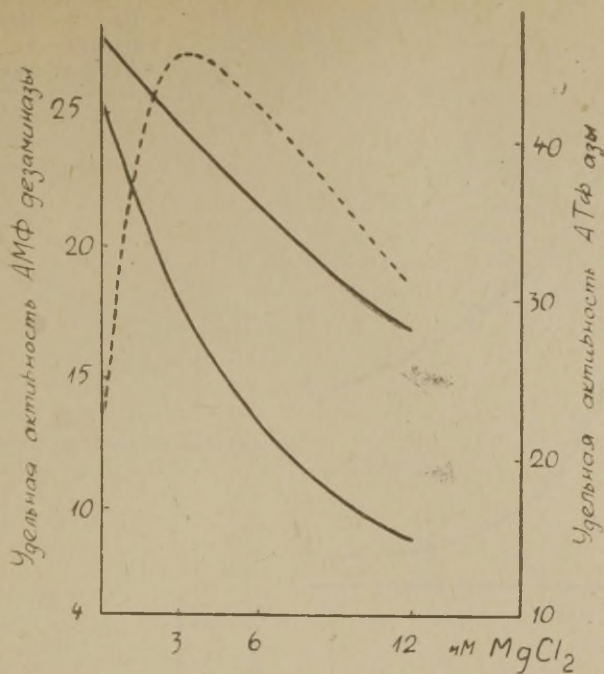


Рис. 2. Влияние ионов магния на активность АМФ-деаминазы (сплошная линия) и АТФазы (пунктирная линия) микросом головного мозга.

Условия опыта те же, что и к рис. 1.

Аналогичные данные были получены при изучении влияния ионов магния на АМФ-деаминазу микросом мозга (рис. 2).

В растворимой цитоплазматической фракции АТФазная активность очень незначительна и не мешает изучению влияния магния на АМФ-деаминазы.

На рис. 3 представлены кривые зависимости активности АМФ-деаминазы растворимой цитоплазматической фракции от концентрации ионов магния при малой (20 мМ) и большой (130 мМ) концентрации ионов натрия.

Можно видеть резкое снижение деаминазной активности при 2—6 мМ концентрации магния и низкой концентрации натрия. При высокой концентрации натрия торможение активности фермента ионами магния менее выражено. Такие же результаты получены при изучении влияния магния на активность АМФ-деаминазы растворимой фракции митохондрий (зона 1). На этом же ферментном препарате было обнаружено, что ионы кальция также оказывают тормозящее действие на активность АМФ-



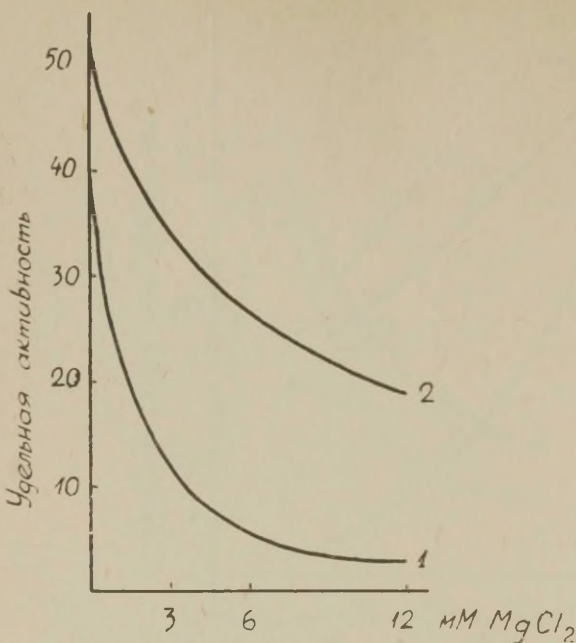


Рис. 3. Влияние ионов магния на активность АМФ-деаминазы растворимой цитоплазматической фракции головного мозга.

Условия опыта те же, что и к рис. 1.

деаминазы, причем натрий и калий в больших концентрациях оказывают также некоторый защитный эффект.

В той сложной системе, в которой мы изучали АМФ-деаминазу (наличие АТФазы, миокиназы, нуклеотидаз), трудно было искать объяснение механизма торможения ее активности ионами магния. Магний мог и не оказывать непосредственного влияния на АМФ-деаминазу, но, активируя АТФазу и миокиназу, мог изменять оптимальные соотношения субстрата и активатора АМФ-деаминазы и тем самым снижать ее активность.

Поэтому в дальнейшем мы изучали влияние ионов магния на активность частично очищенного фермента. Способ очистки фермента описан нами ранее (9). Он заключался в экстрагировании фермента из ацетонового порошка головного мозга водой, высаливании его сернокислым аммонием (до 0,3 насыщения), хроматографии на сефадексе Г-200. Полученный ферментный препарат был лишен активности АТФазы, миокиназы, нуклеотидазы и аденозин-деаминазы.

На рис. 4 представлены кривые зависимости активности АМФ-деаминазы от концентрации ионов магния в отсутствии ионов натрия и калия (1) и в присутствии 20 мМ (2) и 130 мМ (3) этих ионов.

Можно видеть, что ионы магния почти полностью ингибируют активность АМФ-деаминазы в отсутствии ионов натрия и калия. Ионы натрия и калия, активирующие фермент в отсутствии

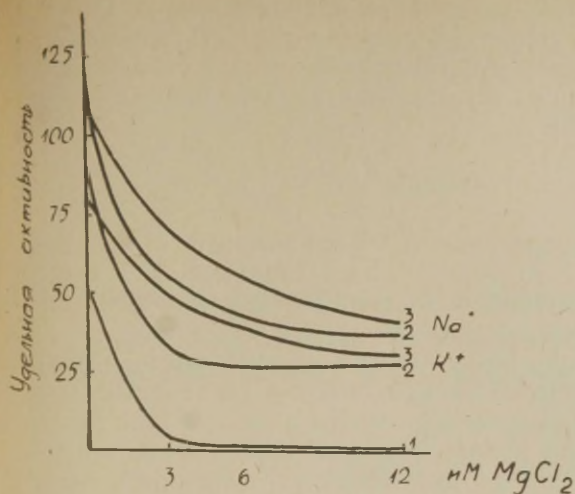
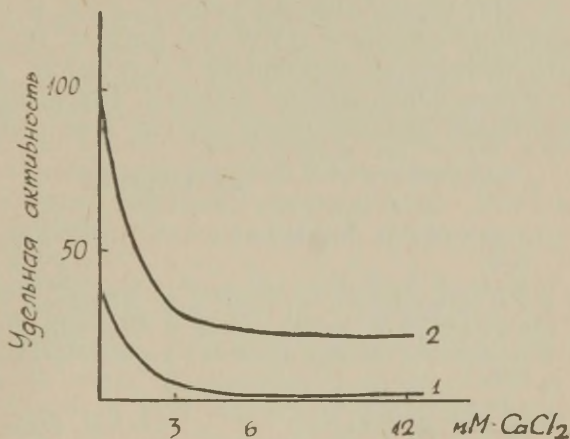


Рис. 4. Влияние ионов магния на активность частично очищенной АМФ-деаминазы в отсутствии ионов натрия и калия (1) и в присутствии 20 мМ (2) и 130 мМ (3) этих ионов. Условия те же, что и к рис. 1.

Рис. 5. Влияние ионов кальция на активность частично очищенной АМФ-деаминазы в отсутствии (1) и в присутствии 20 мМ (2) NaCl.

Условия те же, что и к рис. 1.



ионов магния, теряют свою активирующую способность в его присутствии, но вместе с тем частично снимают тормозящее влияние ионов магния. Кроме того, с увеличением концентрации ионов натрия и калия усиливается их защитное действие.

На очищенном препарате фермента было также подтверждено тормозящее влияние ионов кальция на активность АМФ-деаминазы (рис. 5).

Торможение АМФ-деаминазы ионами магния и кальция можно было бы объяснить следующим образом. Деаминаза активна лишь в присутствии АТФ, которая, как предполагают (12), выступает в качестве аллостерического активатора фермента. Натрий и калий образуют комплексы с АТФ (13). Возможно, что комплексы Na-АТФ и К-АТФ являются наиболее эффектив-

ными активаторами АМФ-деаминазы. Образование комплексов Mg-АТФ и Са-АТФ лишает АТФ активирующей способности. Наиболее полно выражено это торможение в присутствии ионов натрия и калия, т. е. при отсутствии их конкуренции за образование комплексов с АТФ.

### Выводы

1. Изучалось распределение АМФ-деаминазы в митохондриальных субфракциях головного мозга кроликов. 18% общего количества фермента грубой митохондриальной фракции сосредоточено во фракции чистых митохондрий.

2. Изучалось влияние ионов магния на активность АМФ-деаминазы митохондриальной, микросомной и растворимой цитоплазматической фракций головного мозга в присутствии различных концентраций ионов натрия и калия. Обнаружено тормозящее влияние ионов магния на деаминазную активность указанных фракций.

3. Изучалось влияние ионов магния и кальция на частично очищенный препарат АМФ-деаминазы. Ионы магния и кальция почти полностью ингибируют активность АМФ-деаминазы в отсутствии ионов натрия и калия. Последние частично снимают тормозящее влияние ионов магния и кальция.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Полякова Н. М., Малышева М. К. Укр. біохім. журн., **33**, 713, 1961.
2. Muntz J. A., J. Biol. Chem., **201**, 221, 1953.
3. Weil-Malherbe H., Green R. H., Biochem. J., **61**, 218, 1955.
4. Mendicino J., Muntz J. A., J. Biol. Chem., **233**, 178, 1958.
5. Малышева М. К., Полякова Н. М., Укр. біохім. журн., **37**, 360, 1965.
6. Askary A., Science, **141**, 44, 1963.
7. Askary A., Franklin J. E., Biochim. Biophys. Acta, **110**, 162, 1965.
8. Askary A., Nature, **202**, 185, 1964.
9. Малышева М. К., Укр. біохім. журн., **37**, 370, 1965.
10. Askary A., VI International Congress of Biochemistry, New York, 1964, Abstr. VIII-3.
11. Whittaker V. P., Biochem. J., **72**, 694, 1959.
12. Cunningham B., Lowenstein J. M., Biochim. Biophys. Acta, **96**, 535, 1965.
13. Melchior N. C., J. Biol. Chem., **208**, 615, 1954.



## БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АТФазной АКТИВНОСТИ РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ И ДЕГЕНЕРИРУЮЩИХ НЕРВОВ

О. М. Рожманова, О. В. Кирсенко

Институт биохимии АН Укр. ССР, Киев

Одним из основных ферментов, участвующих в энергетических превращениях АТФ, является АТФаза. Наличие АТФазы во всех внутриклеточных структурах мозга (1—3) свидетельствует о важности этого фермента для нервной ткани. Учитывая сложную морфологию нервной клетки и своеобразие функций отдельных ее частей, мы решили исследовать АТФазную активность проводниковых элементов нервной клетки-аксонов.

В нашу задачу входило изучение распределения АТФазной активности между субклеточными фракциями регенерирующего и дегенерирующего нервов.

Перерезка нервных волокон неизбежно вызывает глубокие изменения как в теле нервной клетки, так и в отторгнутой от нее дистальной части волокна. Глубокие изменения происходят также в проксимальной части перерезанного нерва, так как от нее начинается регенерация поврежденного нервного волокна.

### Методы

Опыты проводились на кошках. Под эфирным наркозом левый седалищный нерв животного перерезался на уровне большого трохантера бедра.

В одной серии опытов концы перерезанного нерва не смешались, проксимальный отрезок оставался свободным, поэтому через некоторое время после операции он легко срастался с дистальным отрезком и, на смену дегенеративным процессам, которые имели место вначале, приходили интенсивные процессы регенерации. В том случае, когда нам нужно было получить картину дегенерирующего нерва, мы смещали концы перерезанного нерва и пришивали проксимальный отрезок к сверхлежащей мышце. В этих условиях возможность сращения концов перерезанного нерва исключалась, и на дистальном отрезке нерва можно было наблюдать полную картину Валлеровской дегенерации.

Через 2, 14, 32, 60, 90, 180 и 220 дней после операции животных забивали декапитацией, извлекали сегменты нерва, лежащие выше и ниже места пере-

резки и исследовали их. Контролем служил соответствующий участок пра-вого седалищного нерва того же животного.

Ткань измельчалась ножницами, затем гомогенизировалась в течение 5 минут в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в 0,25 М сахарозе. Для устранения обрывков волокон и соединительной ткани гомогенат центрифугировали при 1300 g и полученный осадок отбрасывали. Надосадочную жидкость подвергали фракционированию путем дифференциального центрифугирования. При 20 000 g (20 мин.) получали осадок, который обозначался как фракция I, а осадок, получаемый при 75 000 g (90 мин.), обозначался как фракция II.

С помощью полярографического метода определялось дыхание в обеих фракциях в присутствии сукцината натрия. Поскольку дыхание связано в основном с фракцией I, можно сказать, что эта фракция состоит главным образом из митохондрий, а фракция II соответствует микросомам. Реакционная смесь для определения АТФазной активности состояла из трис-HCl буфера рН 7,4 — 0,092 М; АТФ (соль-трис) — 0,002 М;  $MgCl_2$  — 0,002 М; ЭДТА — 0,0002 М. Суспензия содержала 0,2 — 1,0 мг белка. Реакция длилась 15 минут при 37°C и останавливалась добавлением 20% ТХУ. Отщепившийся от АТФ под влиянием АТФазы фосфор определяли по методу Фiske и Суббароу. Активность фермента выражали в мкг Р на мг белка.

Для гистохимического определения АТФ-азы применяли метод Вахштейна и Мейзеля (4). Этот метод используется многими авторами для гистохимического выявления АТФазы в нервной и других тканях. Фермент, определяемый этим методом, идентифицируется как специфическая АТФаза (5).\*

## Результаты опытов и их обсуждение

Прежде чем перейти к рассмотрению изменений АТФазной активности субклеточных фракций дегенерирующего и регенерирующего нервов, следует остановиться на распределении этой активности во фракциях нормального нерва (рис. 1).

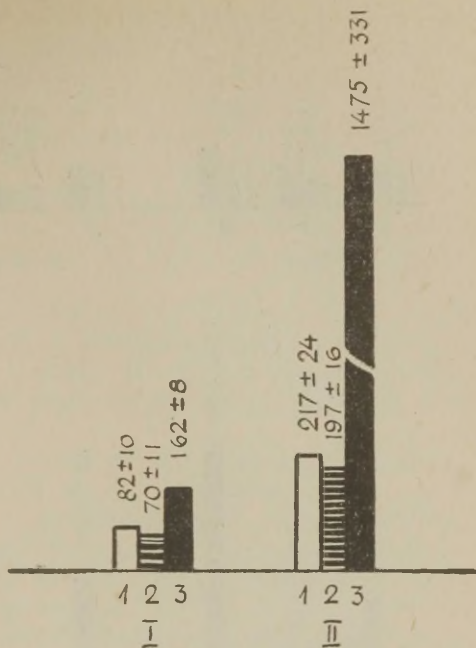
Исследуя периферические нервы кошек, кроликов и собак, мы обнаружили, что АТФазная активность седалищных нервов разных животных не одинакова. У собак и кошек она значительно ниже, чем у кроликов. Активность фермента в гомогенате седалищного нерва всех изученных животных довольно высокая, она даже несколько превышает активность фракции I. В этом отношении наши данные отличаются от данных, полученных для мозга, где АТФазная активность гомогената значительно ниже активности митохондрий (3). Самая высокая АТФазная активность была обнаружена во фракции II, которая соответствует микросомам. АТФаза микросомной фракции нервной ткани представляет особый интерес, т. к. многие авторы склонны приписывать ей особое участие в выполнении нейроном его физиологической функции — проведении импульса.

Аналогичные исследования, проведенные на зрительном нерве кошек (относящемся к центральной нервной системе),

---

\* Выражаем глубокую благодарность старшему научному сотруднику Института физиологии им. А. А. Богомольца АН Укр. ССР Олейниковой Татьяне Николаевне за помощь в проведении гистохимических исследований.

Рис. 1. АТФазная активность гомогената и субклеточных фракций седалищного и зрительного нервов в норме (в мкг Р/мг белка,  $M \pm \sigma$ ). I — седалищный нерв; II — зрительный нерв; 1 — гомогенат; 2 — митохондрии; 3 — микросомы.



показали, что АТФазная активность гомогената и всех субклеточных фракций зрительного нерва в несколько раз превосходит активность фермента в седалищном нерве. Подобную картину относительно 12 других ферментов наблюдали Мак Каман и Робинс (6). Это позволяет предположить, что уровни метаболизма в центральных и периферических нервах различны. Характер распределения АТФазной активности в субклеточных фракциях зрительного нерва такой же, как и во фракциях седалищного нерва.

Интересным является то, что распределение активности АТФазы по фракциям седалищного и зрительного нервов полностью совпадает с распределением активности фермента в аналогичных фракциях белого вещества мозга (7). Поэтому можно предположить, что высокая АТФазная активность микросомной фракции свойственна именно проводящим путям нервной ткани, каковыми являются белое вещество мозга, центральные и периферические нервы.

Изложение результатов, полученных на перерезанных нервах, мы начнем с тех опытов, в которых были сохранены условия для регенерации нерва. Как видно из рис. 2, на второй день после перерезки нерва АТФазная активность гомогената и субклеточных фракций дистального участка перерезанного нерва была несколько выше, чем активность в проксимальном отрезке и в



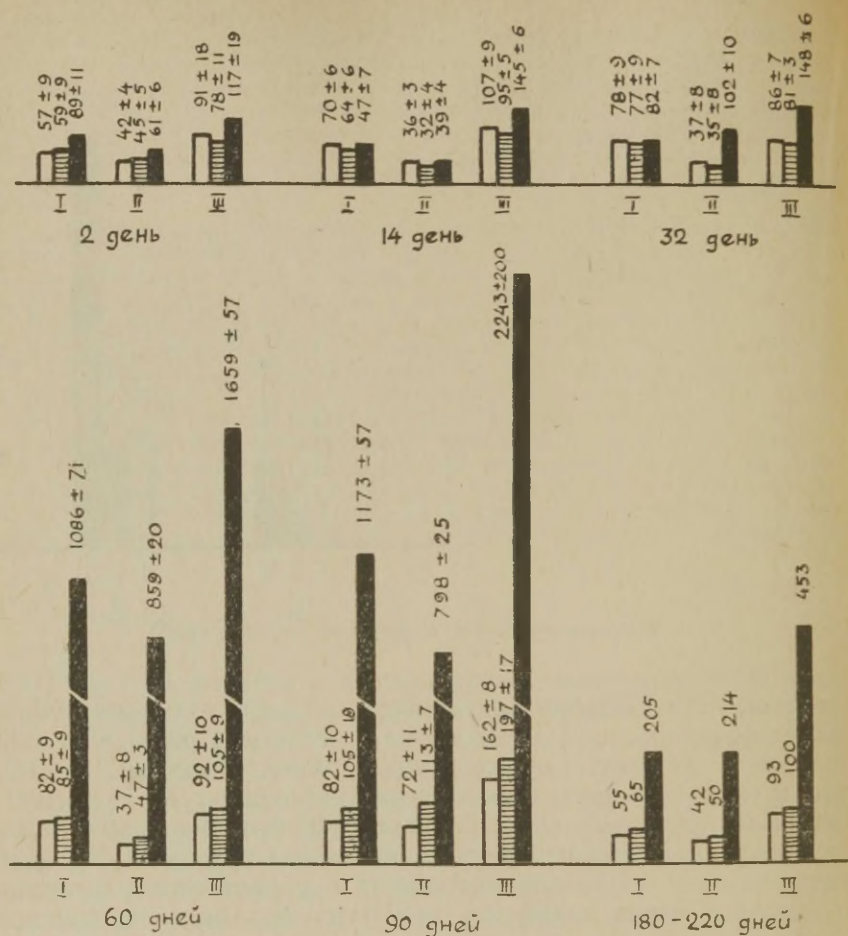


Рис. 2. АТФазная активность гомогената и субклеточных фракций регенерирующего нерва в различные сроки после операции (в мкг Р/мг белка,  $M \pm \sigma$ ). I — гомогенат; II — 1-я фракция; III — 2-я фракция; □ — контроль; ▨ — проксимальный участок; ■ — дистальный участок.

контрольном нерве. Но такую же картину мы наблюдали ранее (8) в нормальном нерве. Следовательно, наблюдаемое на 2-ой день после перерезки нерва в дистальном участке небольшое повышение АТФазной активности не является еще результатом дегенеративных процессов.

Соотношение АТФазной активности дистальной и проксимальной частей перерезанного нерва и контрольного нерва на 14-й и 32-й день остается почти таким же, как и на второй день, но уже наблюдается некоторая явная тенденция к повышению

активности фермента в дистальной части. Более ярко это выражено на фракциях I и II на 32-й день. Начиная с этого времени активность АТФазы в гомогенате и во фракциях дистальной части нерва прогрессивно возрастает и на 60-й день она резко увеличивается, в 15—18 раз превышая активность контроля. На 90-й день активность фермента остается на таком же высоком уровне. Опыты, поставленные на 180-й и 220-й день после перерезки, показали, что к этому времени происходит падение активности фермента, но все же она еще намного выше контроля.

Все это напоминает данные Холлингера и сотр. (9) об АТФазе, активируемой ионами  $\text{Ca}^{++}$  в регенерирующем после раздавливания нерве кошки. Эти авторы наблюдали максимальную активность фермента в целом гомогенате нерва на 96-й день после операции.

По литературным данным самые резкие изменения в активности многих ферментов (9—11) и в содержании химических веществ (12, 13) происходят в дегенерирующем нерве в первые 14—16 дней. Возможно это связано с максимальной пролиферацией шванновских клеток в это время, с одной стороны, и с полным разрушением аксонов — с другой.

Если бы повышение АТФазной активности, которое мы наблюдали, происходило бы только за счет интенсивной пролиферации шванновских клеток, то максимальное увеличение активности должно было бы наблюдаться также на 14—16-й день, но в наших опытах активность АТФазы начинает увеличиваться после 30-ти дней регенерации.

Известно, что примерно на 30—32-й день после перерезки нерва начинается период отрастания молодых аксонов. Можно было бы предположить, что именно им или их колбам роста свойственна такая высокая АТФазная активность. Тем более, что для некоторых ферментов это было показано (11, 14).

Для проверки этого предположения мы поставили серию опытов, в которых, как уже отмечалось, проксимальная часть перерезанного нерва пришивалась к сверхлежащей мышце и, таким образом, возможность регенерации устранялась. Исследования проводились на 32-й и 60-й дни после операции. Если вышеизложенное предположение верно, то в этой серии опытов мы не должны были бы наблюдать повышения АТФазной активности в дегенерирующем дистальном участке перерезанного нерва.

Данные об АТФазной активности гомогената и субклеточных фракций нерва, подвергнутого Валлеровской дегенерации, представлены на рис. 3. Из этого рисунка видно, что активность фермента как в гомогенате, так и в субклеточных фракциях на 32-ой день была очень высокой, намного выше, чем активность в это же время в дистальной части регенерирующего нерва. На 60-й

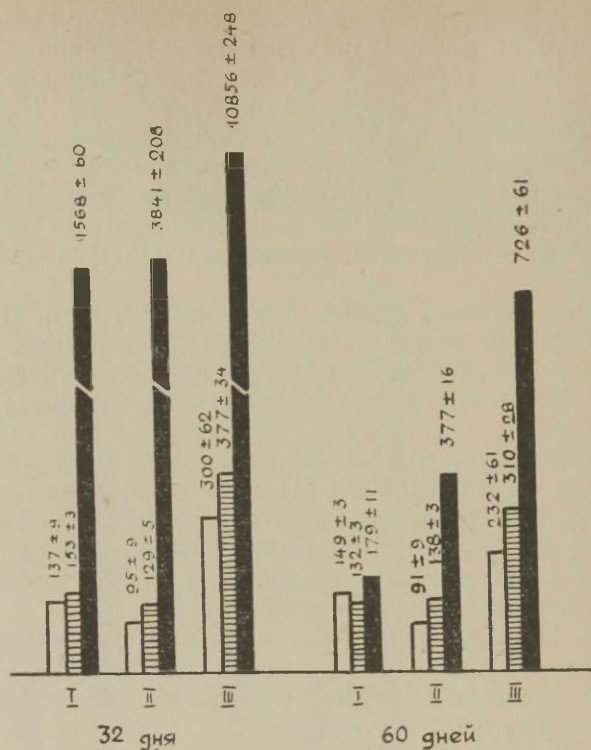


Рис. 3. АТФазная активность гомогената и субклеточных фракций нервов, подвергшихся Валлеровской дегенерации (в мкг Р/мг белка,  $M \pm \sigma$ ).  
Обозначения см. к рис. 2.

день дегенерации АТФазная активность в дистальной части нерва снизилась, но оставалась все же намного выше активности контрольного нерва. Поэтому остается предположить, что сильное увеличение АТФазной активности в дистальной части нерва при перерезке его все же является следствием дегенеративных процессов.

Однако, если причиной повышения АТФазной активности является интенсивная пролиферация шванновских клеток, то все-таки остается не совсем ясным, почему в опытах на регенерирующем нерве максимум АТФазной активности не совпадает во времени с максимумом, полученным при исследовании нервов, подвергшихся Валлеровской дегенерации.

Очевидно, при срастании перерезанных частей нерва интенсивные регенерационные процессы осуществляют влияние на процессы дегенерации. Поэтому картина изменения ферментативной





Рис. 4. Нормальный седалищный нерв кошки. Ядра шванновских клеток окрашены гематоксилином. Увеличение 160X.

активности во времени иная, чем при классической Валлеровской дегенерации отрезанной части нерва.

То, что повышение АТФазной активности, обнаруженное биохимическими методами, в регенерирующих и дегенерирующих нервах обусловлено пролиферирующими шванновскими клетками, подтверждается также гистохимическими исследованиями.

Как уже неоднократно подчеркивалось многими исследователями, после перерезки нерва начинается бурная пролиферация шванновских клеток. Эта известная из литературы картина очень наглядно была воспроизведена нами при окраске ядер гематоксин-эозином на препаратах нормального (рис. 4) и регенерирующего (рис. 5) нервов.

Как видно из рис. 6, в нормальном нерве темное окрашивание, обусловленное действием Mg-активируемой АТФазы, наиболее интенсивно в шванновской оболочке. Следовательно, шванновские клетки являются носителем наиболее активной Mg-активируемой АТФазы в нерве. Ферментативная активность также обнаруживается в осевом цилиндре аксона и в его митохондриях. Шванновская оболочка отделена от аксона совершенно не окрашенной полоской миелиновой оболочки, что говорит о полном



Рис. 5. Дистальный участок регенерирующего нерва на 90-й день после операции. Ядра шванновских клеток окрашены гематоксилином. Увеличение 160 $\times$ .

отсутствии АТФазы в миелине нерва. После перерезки нерва четкая упорядоченность его структуры в дистальном участке исчезает. По литературным данным (15), морфологическим изменениям подвергается осевой цилиндр и миелиновая оболочка. В этот период шванновские клетки играют очень важную роль. Они проявляют усиленную фагоцитарную деятельность и играют решающую роль в процессах удаления продуктов распада.

При определении АТФазной активности в препаратах нервов, взятых на 20-й день после перерезки, мы обнаружили, что упорядоченность окрашенного материала, которую мы наблюдали в нормальном нерве, исчезает. Глыбки окрашенного материала хаотически разбросаны по всему полю препарата. К 60—90-му дням регенерации нерва активность АТФазы, выявляемая биохимическими методами в дистальном участке нерва, многократно возрастала по сравнению с контролем. Такая же картина наблюдается и на гистохимических препаратах (рис. 7). Интенсивно окрашенные многочисленные шванновские клетки заполняют все поле препарата.



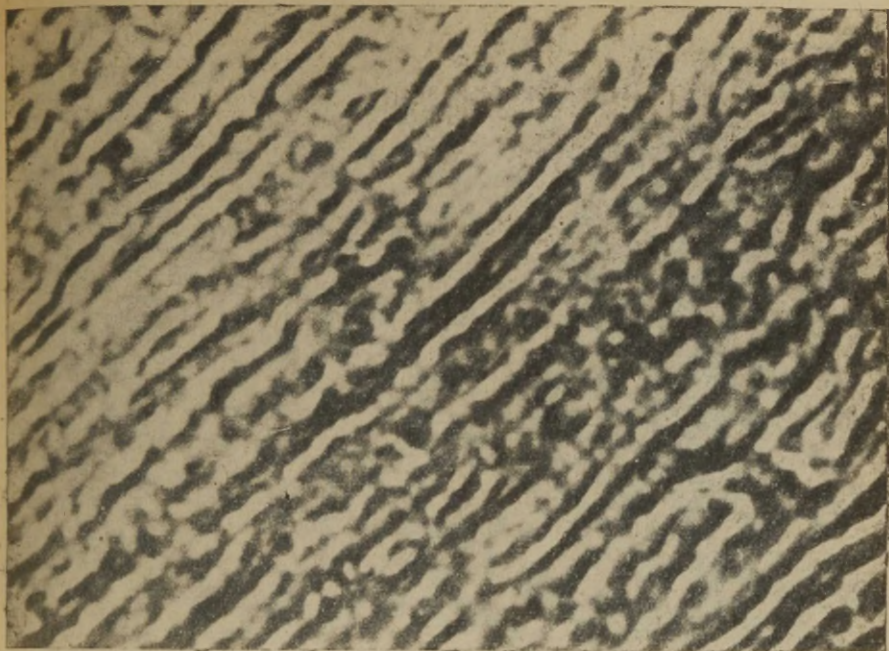


Рис. 6. АТФазная активность нормального седалищного нерва кошки. Увеличение 160 $\times$ .

В наших исследованиях в проксимальном отрезке перерезанного нерва наряду с незначительными дегенеративными изменениями, носящими, как правило, очаговый характер, существенных изменений морфологических структур, по сравнению с контролем, не обнаружено. Здесь высокая АТФазная активность выявлена, как и в контроле, в шванновской оболочке, по краям цитоплазмы и в митохондриях аксона. Эти данные хорошо согласуются с биохимическим исследованием АТФазы в проксимальном участке регенерирующего нерва, где было отмечено в основном незначительное увеличение активности фермента в этой части нерва.

Таким образом биохимические и гистохимические исследования позволяют считать, что такой высокой АТФазной активностью, которую мы обнаруживаем в дистальной части дегенерирующих и регенерирующих периферических нервов, обладают пролиферирующие шванновские клетки.

В функциональном отношении шванновские клетки теснейшим образом связаны с нервными волокнами, и посредством их совершается обмен веществ между нервными волокнами и окру-



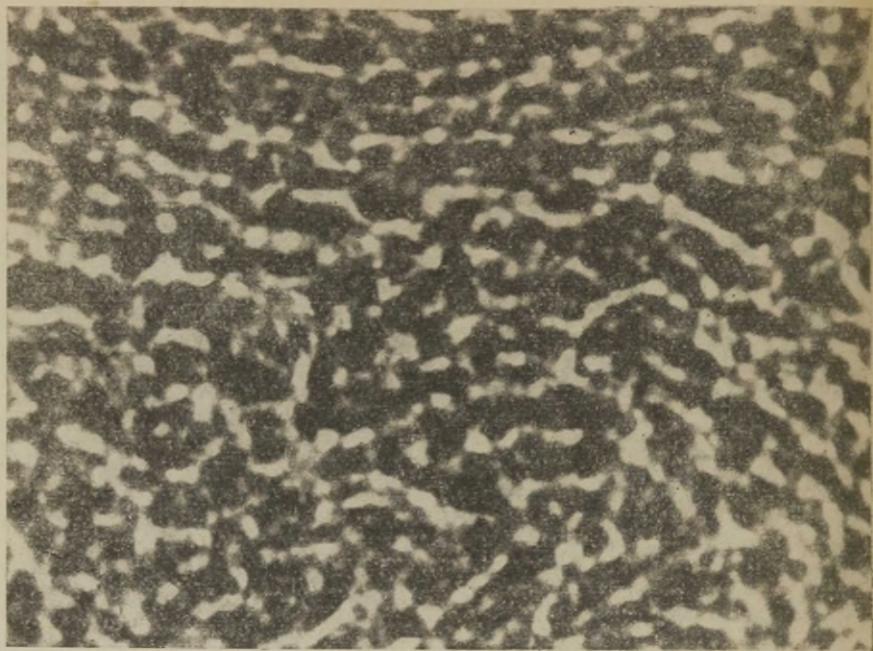


Рис. 7. АТФазная активность в дистальном участке регенерирующего нерва на 60-й день после операции. Увеличение  $160\times$ .

жающей тканью. При дегенеративных процессах нервного волокна шванновские клетки проявляют фагоцитарную деятельность и участвуют в расщеплении и удалении продуктов распада.

Нам кажется, что наиболее вероятным предположением является то, что такое резкое повышение активности АТФазы связано с фагоцитарной функцией, которую осуществляют шванновские клетки в регенерирующих нервных волокнах на протяжении многих месяцев после повреждения волокна.

### Выводы

1. Изучение АТФазной активности регенерирующего после перерезки нерва показало, что в его дистальной части АТФазная активность начинает возрастать на 32-й день после перерезки, достигая максимума на 60—90-й день. В это время она в 15—18 раз превышает активность контроля. На 180 и 220-й день активность АТФазы снижена, но остается значительно выше, чем в контроле.

2. В дистальной части нерва, подвергшегося Валлеровской дегенерации, активность АТФазы сильно повышена уже на 32-й день после операции и несколько снижена на 60-й, оставаясь, однако, намного выше уровня ферментативной активности в контроле.

3. АТФазная активность в проксимальном и дистальном участках нерва, регенерирующего после перерезки, и нерва, подвергшегося Валлеровской дегенерации, распределялась между гомогенатом и субклеточными фракциями так же, как и в контрольном нерве: самую высокую активность проявляла фракция II, затем гомогенат и фракция I.

4. Активность АТФазы гомогената и субклеточных фракций проксимальной части нерва, регенерирующего после перерезки, и нерва, подвергшегося Валлеровской дегенерации, приближается к активности фермента в контрольном нерве.

5. С помощью гистохимического метода Вахштейна и Мейзеля показано, что в нормальном нерве максимальная АТФазная активность сосредоточена в шванновской оболочке. Активность фермента довольно четко выражена также в митохондриях аксона и в пристеночных слоях аксоплазмы, граничащих с миелином. В миелиновой оболочке АТФазная активность отсутствует.

6. В дистальном участке регенерирующего и дегенерирующего нервов очень высокая АТФазная активность сосредоточена в пролиферирующих шванновских клетках.

7. В проксимальном участке перерезанного нерва локализация АТФазной активности в основном сходна с нормой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abood L., Gerard R., Amer. J. Physiol., **168**, 728, 1952.
2. Cseh G., Hermann V., Zombori J., Acta Physiol. Acad. Scient. Hungaricae, **5**, 353, 1954.
3. Палладин А. В., Кирсенко О. В., Биохимия, **26**, 385, 1961.
4. Wachstein M., Maisel E., J. Histochem. Cytochem., **4**, 592, 1957.
5. Hori S. H., Chang J. P., J. Histochem. Cytochem., **11**, 71, 1963.
6. Mc Saman R. E., Robins E., J. Neurochem., **5**, 32, 1959.
7. Кирсенко О. В., Палладин А. В., Рожманова О. М., Ейсмонт С. С., Укр. біохім. журн., **35**, 807, 1963.
8. Рожманова О. М., Укр. біохім. журн., **38**, 111, 1966.
9. Hollinger D. M., Rossiter R. J., Upmalis H., Biochem. J., **52**, 652, 1952.
10. Hollinger D. M., Rossiter R. J., Biochem. J. **52**, 659, 1952.
11. Samorajski T., J. Histochem. Cytochem., **5**, 15, 1957.
12. Johnson A. C., McNabb A. R., Rossiter R. J., Arch. Neurol. Psychiatry, **64**, 1, 1950.
13. Mc Saman R., Robins E., J. Neurochem., **5**, 18, 1959.
14. Фукс Б. Б., ДАН СССР, **118**, 400, 1958.
15. Дойников Б. С., Избранные труды по нейроморфологии и невропатологии. Медгиз, М., 1962.

## ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ УГНЕТЕНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МОЗГА *IN VIVO* ПРИ ВВЕДЕНИИ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ

В. И. Розенгарт, В. Г. Шмелева, И. Г. Щербак

Кафедра биохимии 1-го Медицинского института им. акад. И. П. Павлова,  
Ленинград

Для характеристики действия антихолинэстеразных веществ на организм целого животного необходимо прежде всего точно знать, как протекает под влиянием этих веществ угнетение холинэстеразы (ХЭ) мозга, так как именно этот процесс определяет важнейшие токсические эффекты ингибиторов ХЭ.

Вместе с тем точная оценка степени угнетения ХЭ *in vivo* в короткие сроки после введения животным фосфорорганических ингибиторов ХЭ чрезвычайно затруднена тем, что в процессе умерщвления животных и подготовки тканей для анализа происходит дополнительное угнетение фермента, которое, в зависимости от условий, может быть весьма значительным.

Это дополнительное угнетение зависит в основном от двух обстоятельств. Во-первых, от того, что ингибитор, находящийся в контакте с ХЭ, продолжает взаимодействовать с ней во время всех методических процедур вплоть до прибавления к исследуемому образцу ткани избытка ацетилхолина. Во-вторых, ингибитор, пространственно отделенный от фермента в ненарушенных структурах, может прийти в контакт с ним в результате гомогенизации ткани. Вероятно, это второе обстоятельство имеет меньшее значение при исследовании липофильных ингибиторов, легко проникающих через клеточные мембраны.

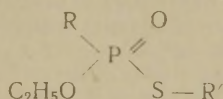
Литературные данные об угнетении ХЭ тканей фосфорорганическими ингибиторами (ФОИ) в опытах *in vivo* достаточно противоречивы и в подавляющем большинстве случаев касаются не скорости угнетения фермента в короткие сроки после введения ФОИ, а динамики последующего восстановления активности ХЭ через много часов и суток после отравления животного (1, 2).



Задача данной работы состояла в сравнительном исследовании кинетики угнетения ХЭ мозга *in vitro* и *in vivo* четырьмя ФОИ, близкими по структуре, но отличающимися по токсичности и по антихолинэстеразной эффективности. Полученные данные мы стремились использовать для оценки скорости прониновения ингибиторов в центральную нервную систему и концентрации активного ингибитора в ткани мозга.

### Вещества и методы

В качестве объекта исследования мы выбрали 4 ФОИ с общей формулой:



Все вещества были синтезированы в лаборатории академика М. И. Кабачника в Институте элементоорганических соединений АН СССР. Их антихолинэстеразная эффективность, оцениваемая бимолекулярной константой ( $k_{11}$ ) скорости угнетения ХЭ, была изучена нами ранее (3).

Данные о структуре исследованных соединений и об их способности угнетать ХЭ разного происхождения представлены в таблице 1. Известно, что при взаимодействии веществ такого типа с ХЭ S-алкильный радикал отщепляется, а остаток ФОИ — фосфорильная группа присоединяется к гидроксилу серина в активном центре фермента.

Таблица 1

**Антихолинэстеразная активность ФОИ строения  
 $\text{R}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SR}'$  [по данным (3)]**

Ингибитор			$k_{11}(\cdot 10^3)$	л · моль <sup>-1</sup> · мин <sup>-1</sup>
Шифр	R	R'	Гомогенат мозга крыс	Очищенная ХЭ сыворотки лошади
ЛГ-63	CH <sub>3</sub>	n-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	11,10 ± 0,62	29,00 ± 2,55
ГД-189	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	n-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	0,08 ± 0,008	23,10 ± 2,19
ЛГ-56	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	2,70 ± 0,13	5,00 ± 0,87
ГД-187	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,17 ± 0,020	6,10 ± 0,57

Из таблицы видно, что исследованные нами вещества отличались друг от друга строением как фосфорильной группы, так и отщепляемой части. Два соединения (ГД-189 и ГД-187) были фосфатами, а два (ЛГ-63 и ЛГ-56) — фосфонатами. Отщепляемая часть у всех веществ содержала изомерные алкилы, но у двух (ЛГ-63 и ГД-189) эти алкилы имели нормальное строение, а у двух других (ЛГ-56 и ГД-187) — разветвленное. Главные различия в антихолинэстеражном действии состояли в том, что при переходе от фосфонатов к фосфатам резко снижалась способность угнетать ХЭ мозга, тогда как действие на фермент сыворотки не менялось.

При разработке методики исследования мы исходили из основной задачи нашей работы (сравнительное изучение угнетения ХЭ мозга *in vitro* и *in vivo*)

и стремились прежде всего исключить дополнительное угнетение ХЭ мозга после умерщвления животных, которое могло происходить вследствие продолжающегося контакта фермента с ингибитором. Несколько специально поставленных контрольных серий опытов позволили установить следующее.

1. Если мышам ввести ингибитор *in vivo* и через короткое время приготовить гомогенат мозга, то при хранении этого гомогената при комнатной температуре угнетение ХЭ в нем будет заметно прогрессировать во времени.

2. Точно такое же прогрессирование угнетения наблюдается при добавлении ингибитора к гомогенату мозга *in vitro*. Однако если смесь гомогената с ингибитором охладить до 0°C, то дальнейшего угнетения не происходит.

3. При смешивании *in vitro* охлажденных до 0°C гомогената мозга и раствора ингибитора и при последующем хранении смеси при 0°C никакого угнетения ХЭ в течение 30 мин. не наблюдается.

4. Если гомогенат мозга отравленной мыши приготовить путем растирания в жидком кислороде, а потом хранить гомогенат при 0°C, то дальнейшего угнетения ХЭ в ходе хранения не наблюдается.

На основании этих данных была принята следующая методика работы. Опыты ставили на мышах. ФОИ вводили внутрибрюшинно в дозе, обеспечивающей выживание мышей в течение 30 мин. Группы по 5—10 животных декапитировали через 2, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. после введения ингибитора, извлекали мозг, замораживали его в жидком кислороде, взвешивали, растирали в ступке при постоянном добавлении жидкого кислорода и полученный гомогенат до анализа хранили при 0°C. Активность ХЭ определяли по Хестрину (4) (конечная концентрация ацетилхолинхлорида  $3 \cdot 10^{-3}$  М, инкубация при 25°C и pH 7,8 в течение 30 мин).

В опытах *in vitro* гомогенат мозга инкубировали с разными концентрациями ингибиторов при 37°C и через различные промежутки времени (2—30 мин) отбирали пробы для определения активности ХЭ.

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 в качестве типичного примера представлены результаты исследования, выполненного с ингибитором ЛГ-63. С остальными ФОИ были получены аналогичные данные. На этом рисунке показана зависимость абсолютной активности фермента от продолжительности его инкубации с разными концентрациями ингибитора *in vitro*, а также от времени, прошедшего после введения ингибитора в условиях *in vivo*. Кривые, как и следовало ожидать, носят экспоненциальный характер и их крутизна зависит от концентрации ингибитора.

Для более точной характеристики кинетики процесса мы попытались несколько иначе оценить полученные нами данные. Известно, что угнетение ХЭ ФОИ протекает (в случае избытка ингибитора) по псевдомономолекулярной реакции, константа скорости которой выражается уравнением

$$k_{II} = \frac{2,303}{t[I]} \cdot \lg \left( \frac{100}{P} \right),$$

где [I] — концентрация ингибитора, P — % активности фермента через t минут. Решение этого уравнения для lg P дает

$$\lg P = 2 - \frac{k_{II}[I]}{2,303} \cdot t.$$

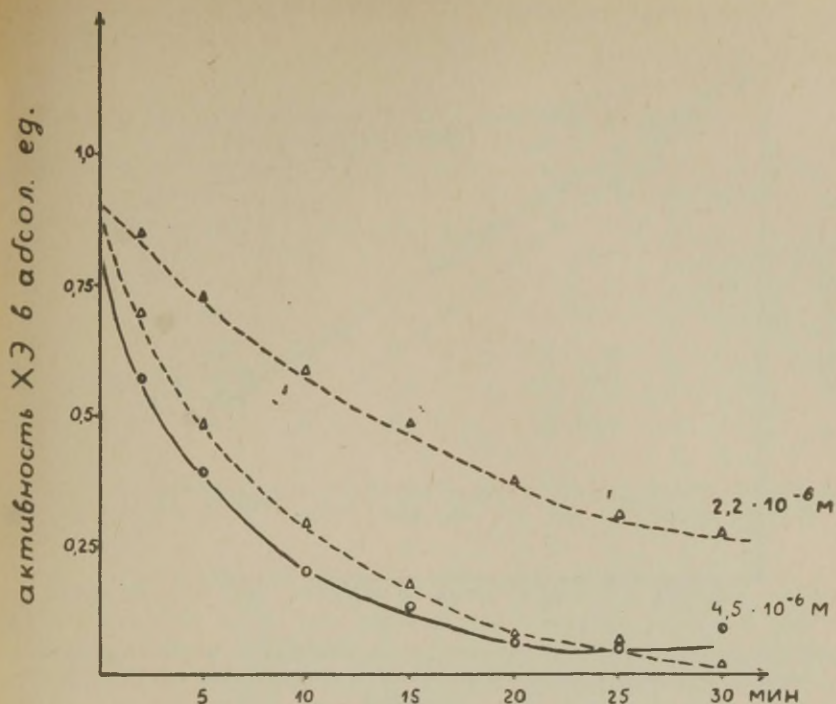


Рис. 1. Кинетика угнетения холинэстеразы мозга мышей ингибитором ЛГ-63 *in vivo* (сплошная линия) и при разных концентрациях *in vitro* (пунктир).

Из этого следует, что зависимость  $\lg P$  от времени для всех концентраций ингибитора должна быть прямолинейной. Правильность этого положения впервые подтвердили Олдридж и Дейвисон (5).

Из рис. 2, на котором результаты наших исследований отложены в координатах  $\lg \% \text{ активности} - \text{время}$ , видно, что ожидаемая прямолинейная зависимость наблюдается не только в опытах *in vitro*, но и в условиях, когда ФОИ вводился целому животному. Из этого следует, что кинетика угнетения ХЭ мозга *in vivo* и *in vitro* одинакова. Далее из рассмотрения рис. 2 вытекает, что в условиях *in vitro* нетрудно подобрать концентрацию ингибитора, которая дает кривую угнетения фермента, практически точно совпадающую с кривой угнетения, полученной в опытах *in vivo*.

Вдвое большие или вдвое меньшие концентрации ингибитора дают резко отличающиеся кривые. С достаточной долей уверенности можно считать, что реальная концентрация ингибитора,



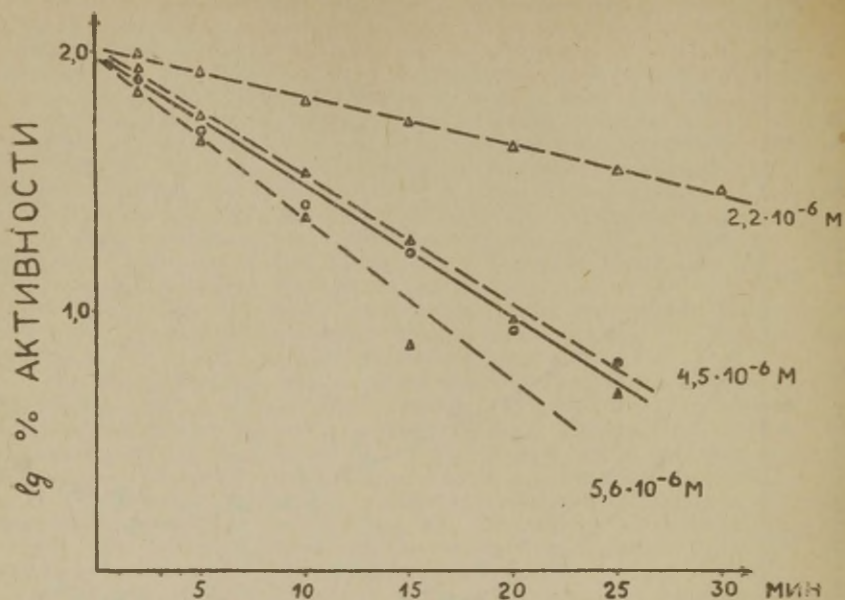


Рис. 2. Зависимость Ig % активности холинэстеразы мозга от продолжительности действия ингибитора ЛГ-63 *in vivo* (сплошная линия) и *in vitro* (пунктир).

создающаяся в мозгу при введении ФОИ целому животному, соответствует той его концентрации, которая обеспечивает в опытах *in vitro* совпадающую кривую угнетения ХЭ. Именно этим соображением мы пользовались для расчета содержания активного ингибитора в ткани мозга.

Совпадение кинетики угнетения ХЭ *in vivo* и *in vitro* говорит еще об одном важном обстоятельстве. Это значит, что в условиях *in vivo* (по крайней мере, при внутрибрюшинном введении) распределение ингибитора по тканям и создание максимальной концентрации в мозгу совершается очень быстро и никакого дополнительного поступления ФОИ в мозг из циркулирующей крови не происходит. В самом деле, если бы такое дополнительное поступление имело место, то в каждую следующую временную точку концентрация ингибитора в мозгу становилась бы больше, чем в предыдущую, что вызывало бы дополнительное торможение фермента и вся кривая угнетения (при ее изображении в координатах, рис. 1) стала бы значительно круче, чем в опытах *in vitro*, а на рис. 2 она утратила бы свою прямолинейность. Ни для одного из исследованных нами ингибиторов мы не наблюдали такого рода тенденций изменения хода кривых.

В таблице 2 сведены результаты наших исследований для всех четырех ФОИ.

Таблица 2

Токсичность исследованных ФОИ и их проникновение в мозг при внутрибрюшинном введении

ФОИ	Токсичность * ЛД-50 в мг/кг	Вводимая доза в мг/кг	Содержание в мозгу	
			М	В % от равномерного распределения
ЛГ-63	10	4	$4,5 \cdot 10^{-6}$	25
ЛГ-56	12	5	$1,5 \cdot 10^{-5}$	67
ГД-189	>120	100	$1,5 \cdot 10^{-4}$	38
ГД-187	>120	100	$2,0 \cdot 10^{-4}$	51

\* Токсичность соединений была определена В. Б. Прозоровским (Ленинградский педиатрический мединститут), за что мы выражаем ему свою признательность.

Из таблицы видно, что фосфонаты (ЛГ-63 и ЛГ-56) оказались значительно более токсичными, чем соответствующие им по строению фосфаты (ГД-189 и ГД-187). Это различие удовлетворительно коррелирует с более выраженной способностью фосфонатов угнетать ХЭ мозга (см. табл. 1). В соответствии с различной токсичностью и вводимая доза веществ была различной для обоих классов соединений. Однако эта разница в дозах не отразилась существенно на способности веществ проникать в ЦНС: при большей дозе концентрация вещества в мозгу тоже была более высокой. Для получения сравнимых данных мы ввели в таблицу графу «% от равномерного распределения». При совершенно равномерном распределении содержание вещества в мозгу должно точно соответствовать дозе, например, при дозе 100 мг/кг и в мозгу должно содержаться 100 мг вещества на 1 кг ткани. Из таблицы видно, что содержание всех соединений в мозгу несколько ниже того, которое должно было наблюдаться при равномерном распределении. Это, вероятно, можно объяснить быстрой фиксацией части вещества кровью и теми тканями (легкие), в которые вещество попадает раньше, чем в мозг. Вместе с тем это отличие от равномерного распределения не очень велико, что говорит о высокой проницаемости гематоэнцефалического барьера для исследованных соединений.

Хорошее проникновение веществ этого типа через тканевые барьеры легко объясняется их выраженной гидрофобностью и, главное, отсутствием электрического заряда в их молекуле. Плохая способность соединений катионной природы проникать в ЦНС известна давно. Попытка количественно оценить это явле-

ние была предпринята Э. В. Зеймаль и др. (6, 7) на примере ряда ФОИ, содержащих сульфониевую группировку. Определенные количества веществ в мозгу удалось обнаружить только при введении очень высоких доз (стократная смертельная доза). При этом оказалось, что содержание соединений в ткани мозга не превышает 2—5% от равномерного распределения. Заслуживает внимания установленный в этих исследованиях факт, что повышение гидрофобности соединений путем удлинения алкильного радикала, связанного с сульфониевой серой, не увеличивало их способности проникать в ЦНС. В свете этих данных найденное нами более выраженное проникновение в мозг вещества ЛГ-56 по сравнению с ЛГ-63 нельзя объяснить вероятной большей гидрофобностью ЛГ-56, содержащего сильно разветвленный радикал при атоме серы. По-видимому, это различие должно быть объяснено более высокой реакционной способностью ЛГ-63 (см. табл. 1) и связанной с этим более быстрой фиксацией ЛГ-63 ХЭ крови и других периферических тканей.

### Выводы

1. Разработан метод, позволяющий фиксировать прижизненную активность ХЭ мозга животных в различные сроки после введения фосфорорганических ингибиторов (ФОИ) холинэстеразы.

2. С помощью этого метода показано, что кинетика угнетения ХЭ мозга *in vivo* при внутрибрюшинном введении четырех ФОИ типа S-алкилтиофосфатов и S-алкилтиофосфонатов разного строения следует уравнению псевдомомолекулярной реакции и не отличается от условий *in vitro*.

3. Распределение ФОИ в организме и их фиксация тканями совершаются быстро, и в первые минуты после введения никакого дополнительного поступления ФОИ в мозг из циркулирующей крови не происходит.

4. Содержание ФОИ в ткани мозга зависит от введенной дозы и лишь немногим ниже того, которое могло бы наблюдаться при равномерном распределении ФОИ в организме.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. Н., Розенгарт В. И., Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. «Медицина», Л., 1964.
2. О'Брайн, Токсичные эфиры кислот фосфора. «Мир», М., 1964.
3. Годовиков Н. Н. и др., ДАН СССР, 174, 603, 1967.
4. Hestrin S. J., Biol. Chem., 180, 249, 1949.
5. Aldridge W. N., Davison A. N., Biochem. J., 51, 62, 1952.
6. Зеймаль Э. В., Фармакология и токсикология, № 2, 157, 1963.
7. Зеймаль Э. В. и др. в сб.: Проблемы гистогематических барьеров. М., стр. 139, 1965.



## МЕСТО СИНТЕЗА ХОЛИНЭСТЕРАЗ,\* ИХ СООТНОШЕНИЯ В ГИДРОЛИЗЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В МОЗГУ ЖИВОТНЫХ

А. Н. Панюков

Лаборатория биохимии Института токсикологии  
Министерства здравоохранения СССР, Ленинград

Изучению распределения и роли ацетилхолинэстеразы (АХЭ), (МКФ 3. 1. 1. 7) посвящена огромная литература (1—6 и др.). Можно считать окончательно доказанным участие синаптической АХЭ в механизме холинэргической передачи нервного импульса. Накапливаются факты по распределению в мозгу животных ложной холинэстеразы (ЛХЭ), (МКФ 3. 1. 1. 8). В этом отношении имеются противоречивые суждения: одни авторы не нашли ЛХЭ в мозгу коров (7) или некоторых отделах мозга других животных (8), другие полагают, что способность гидролизовать бутирилхолин присуща АХЭ (3, 9, 10). Однако с помощью специфических ингибиторов и субстратов удалось расчленить эти ферменты гистохимически, а в опытах *in vitro* оценить для мозга некоторых животных долю ЛХЭ в гидролизе ацетилхолина (11, 12). Наши знания о существовании других ферментов, гидролизующих эфиры холина, находятся в зачаточном состоянии (4). Так, Сойэр и другие (13—17) на основании преобладания скорости гидролиза бензоилхолина над скоростью расщепления АХ предположили наличие в печени морской свинки и кроликов, в плазме некоторых кроликов и в почках быка бензоилхолинэстеразы (МКФ 3. 1. 1. 9). Этот фермент по ряду соображений (18) мы считаем правильнее называть бутирилхолинэстеразой (БХЭ). Какова роль БХЭ — неизвестно, да и ее наличие в организме ставится под сомнение (4).

О роли ЛХЭ предложено несколько гипотез (9, 19—25). Некоторые исследователи утверждают, что ЛХЭ не имеет функцио-

---

\* В этой статье применены следующие дополнительные сокращения: ЛХЭ — ложная холинэстераза; БХЭ — бутирилхолинэстераза; БХ — бутирилхолин; МХ — мехолин; ТИППФ — тетраизопропилпирофосфат.

нального значения (26—28) или роль ее остается невыясненной (29, 30).

Также нет ясности и в вопросе о месте синтеза холинэстераз (ХЭ) мозга и тканей. Полагают лишь, что ЛХЭ плазмы крови синтезируется в печени и, возможно, в кишечнике животных (6, 23).

Предметом настоящего сообщения послужил материал, полученный при изучении распределения АХЭ, ЛХЭ и БХЭ в мозгу и органах животных. Нами показано, что БХЭ встречается всюду, где имеется ЛХЭ, и определена доля ее участия в гидролизе тканями бутирилхолина. Кроме того, добыты первые данные, позволяющие судить о месте синтеза АХЭ. На основании собственного и литературного экспериментального материала высказаны гипотезы о роли БХЭ и ЛХЭ. Отметим, что определение активности ХЭ у собак проведено совместно с О. С. Родионовым, а у оленей — совместно с Н. В. Вобликовой, Н. Я. Фальковой, Л. К. Малиной и Ю. И. Рыковой.

### Методика

Активность ХЭ измеряли в отделах мозга и органах кроликов, кошек, коров, оленей, собак и крыс. Мелких животных умерщвляли отсечением головы, собак — электрическим током, оленей и коров (на бойне) — перерезкой кровеносных сосудов шеи. Мозг очищали от оболочек и кровеносных сосудов. Органы промывали дистиллированной водой и обсушивали фильтровальной бумагой. Отделы мозга и органы гомогенизировали с водой: мозг и его отделы в соотношении 1:9, хвостатое тело — 1:49, печень — 1:2, сердце и легкие — 1:4.

Активность ХЭ определяли по методу Хестрина (31) в нашей модификации (18) по трем субстратам: ацетилхолинхлориду, мехолинбромиду и бутирилхолинйодиду. Пробы инкубировали 60 мин. при 37°C и pH 7,8. Активность ферментов рассчитывали в единицах активности (Е) — в мкМ субстрата, расщепляемого одним г ткани в минуту.

Для обнаружения наличия БХЭ в отделах мозга и органах и оценки доли ЛХЭ в гидролизе ацетил- и бутирилхолинов прибегали к ингибированию активности АХЭ и ЛХЭ или, наоборот, активности БХЭ избирательными ингибиторами, такими как 62С47 [1,5-бис-(4-триметиламмоний фенил-пентан-3-ондйодид)], тетраизопропилпирофосфатом (ТИППФ) и другими (1, 18). В этих случаях в опыт брали такое количество гомогената ткани, которое гидролизует около 15 мг АХ в час. Добавляли к нему ингибитор в концентрации, вызывающей полное торможение активности одного или двух ферментов, объем проб доводили до 10 мл и термостатировали при 37°C. Параллельно инкубировали пробы без ингибитора. Спустя один-два часа (когда достигалось практически максимальное угнетение ферментативной активности) из каждой пробы брали аликвотные части на измерение активности ХЭ по трем субстратам (18) и рассчитывали активность АХЭ и ЛХЭ по АХ и активность БХЭ и ЛХЭ по бутирилхолину. Напомним, что АХЭ гидролизует АХ и мехолин и не разлагает бутирилхолин, ЛХЭ расщепляет ацетил- бутирил- и бензоилхолины и не гидролизует мехолин, а БХЭ разлагает бутирил- и бензоилхолины и не гидролизует мехолин и АХ.

## Результаты исследования и их обсуждение

### 1. Суммарная активность ХЭ по ацетил- и бутирилхолинам в отделах мозга и органах животных.

Как показывают данные табл. 1, из отделов мозга наивысшей способностью гидролизовать АХ обладают гомогенаты хвостатого тела всех видов животных, а наименьшей — гомогенаты больших полушарий. Остальные отделы мозга расщепляют АХ примерно с одинаковыми скоростями. Наши данные в основном совпадают с аналогичными результатами других исследователей (1, 2, 6 и др.).

При сравнении активности ХЭ по АХ в одноименных отделах мозга у разных животных видно, что мозг кроликов, крыс и кошек в 3—7 раз превышает активность мозга коров, оленей и собак. И только в хвостатом теле эти различия невелики, за исключением хвостатого тела мозга оленей. На первый взгляд может показаться, что ацетилхолингидролизующая система в мозгу крыс и кроликов представлена богаче, чем у других обследованных животных. Для более правильного сравнения мощности ацетилхолингидролизующей системы в ряду животных нам представляется целесообразным рассчитывать активность ХЭ не только на г веса ткани, но и на вес того или иного отдела или вес мозга и органа целиком. Эту активность мы предлагаем обозначить «валовой активностью». Вполне закономерно, что чем выше валовая активность ХЭ, тем больше возможностей у данной системы в передаче нервного импульса и в выполнении свойственной этой системе функции.

У коров, кроликов, кошек, собак и, в известной мере, у оленей по валовой активности ХЭ по АХ вне конкуренции стоят большие полушария мозга. Правда, у кошек и оленей валовая активность ХЭ в мозжечке близка к активности в больших полушариях. Интересно отметить, что по валовой ацетилхолинэстеразной активности в одноименных отделах мозг кошек почти равнозначен мозгу кроликов (за исключением мозжечка, где у кошек активность в 3 раза выше). В отделах же мозга коров валовая активность ХЭ примерно в 10—20 раз превышает активность аналогичных отделов мозга кроликов.

Что касается активности ХЭ по АХ во внутренних органах, то, как следует из табл. 1, она выше всего в селезенке и сердце крыс. Наименьшая активность присутствует в поперечно-полосатой мускулатуре и в плазме крови коров и оленей.

Произведенная нами оценка доли активности ХЭ крови, остающейся в мозгу и органах (32), показала, что в мозгу она составляет 0,1—0,6% по АХ и 0,3—1,0% по бутирилхолину (БХ), а в органах — от 1,3 до 12% по АХ и от 0,4 до 30% по БХ.



Суммарная активность АХЭ и ЛХЭ по ацетилхолину (АХ) и ЛХЭ и БХЭ по бутирилхолину (БХ) в гомогенатах отделов мозга и некоторых органов животных. [В единицах активности (Е, М ± m) на г влажной ткани. Инкубация с субстратом 60 мин. при 37°C]

№№ пп.	Вид животных	К-во жи- вотных	Отделы мозга					
			большие полушария		промежут. мозг		хвостатое тело	
			АХ	БХ	АХ	БХ	АХ	БХ
1	Кролики	8	10,60±0,41	2,70±0,19	12,30±0,56	5,90±0,44	49,00±1,6	5,30±0,56
2	Кошки	6	3,80±0,15	2,00±0,18	8,10±0,17	4,80±0,35	47,00±1,7	5,10±0,53
3	Крысы	10	10,10±0,59	1,20±0,04	—	—	—	—
4	Коровы	5	2,70±0,09	0,20±0,03	3,70±0,04	0,50±0,01	42,00±2,6	1,30±0,12
5	Олени, возраст 5 меся- цев	5	2,20±0,48	0,60±0,12	—	—	23,00±0,80	1,00±0,28
6	Олени, возраст 2 года	8	1,40±0,11	0,60±0,07	—	—	22,00±0,67	1,30±0,12
7	Собаки	4	2,00±0,28	0,90±0,08	4,50*±0,30	4,50*±0,28	36,00±1,1	6,70±0,75

№ пп.	Вид животных	К-во жи- вотных	Отделы мозга					
			средний мозг		мозжечек		продолговат. мозг	
			АХ	БХ	АХ	БХ	АХ	БХ
1	Кролики	8	14,60±0,79	5,90±0,34	9,70±0,34	2,40±0,17	12,70±0,41	5,20±0,36
2	Кошки	6	9,30±0,45	5,20±0,37	15,00±1,3	4,50±0,46	8,20±0,28	5,00±0,38
3	Крысы	10	—	—	—	—	—	—
4	Коровы	5	4,80±0,32	0,50±0,01	3,10±0,25	0,70±0,21	3,80±0,08	0,70±0,11
5	Олени, возраст 5 месяцев	5	—	—	5,10±0,14	2,30±0,22	—	—
6	Олени, возраст 2 года	8	—	—	3,80±0,31	3,00±0,23	—	—
7	Собаки	4	—	—	6,60±0,58	1,20±0,15	4,40±0,42	3,20±0,39

№№ пп.	Вид животных	К-во жи- вотных	О р г а н ы							
			сердце		легкое		селезенка		печень	
			АХ	БХ	АХ	БХ	АХ	БХ	АХ	БХ
1	Кролики	8	$0,83 \pm 0,15$	$1,10 \pm 0,23$	$1,20 \pm 0,07$	$1,20 \pm 0,10$	$3,40 \pm 0,41$	$0,54 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,25$	$1,80 \pm 0,27$
2	Кошки	6	$0,37 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,03$	$2,10 \pm 0,33$	$3,20 \pm 0,35$	$0,55 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,37$	$3,50 \pm 0,77$
3	Крысы	10	$2,90 \pm 0,64$	$4,50 \pm 0,48$	$1,00 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,12$	$2,50 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,08$
4	Коровы	5	—	—	—	—	—	—	—	—
5	Олени, возраст 5 месяцев	5	$0,27 \pm 0,032$	$0,23 \pm 0,05$	—	—	$1,95 \pm 0,16$	$2,50 \pm 0,34$	$0,11 \pm 0,013$	$0,20 \pm 0,05$
6	Олени, возраст 2 года	8	$0,36 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,04$	—	—	$1,50 \pm 0,10$	$2,50 \pm 0,48$	$0,24 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,04$

№№ пп.	Вид животных	К-во жи- вотных	К р о в ь					
			цельная		плазма		эритроциты	
			АХ	БХ	АХ	БХ	АХ	БХ
1	Кролики	8	$0,83 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,09$	$0,49 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,13$	$1,40 \pm 0,18$	$0,07 \pm 0,003$
2	Кошки	6	$0,71 \pm 0,04$	$1,50 \pm 0,10$	$0,77 \pm 0,08$	$2,80 \pm 0,25$	$0,62 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,003$
3	Крысы	10	$0,62 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,16$	$0,76 \pm 0,14$	$0,07 \pm 0,005$
4	Коровы	5	$1,10 \pm 0,12$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,009$	$0,05 \pm 0,007$	$2,10 \pm 0,26$	$0,08 \pm 0,01$
5	Олени, возраст 5 месяцев	5	—	—	—	—	—	—
6	Олени, возраст 2 года	8	$1,40 \pm 0,10$	$0,10 \pm 0,017$	—	—	—	—

\* Суммарно в промежуточном и среднем мозге.

Результаты измерения активности ХЭ по БХ (табл. 1) говорят о наличии этой активности во всех отделах мозга и органах подопытных животных. Наиболее низкая активность ее имеется в мозгу коров и наиболее высокая — в мозгу кроликов и кошек.

Величины АХ-БХ коэффициента [молярные отношения скорости гидролиза АХ к скорости гидролиза БХ ( $K_{\frac{ax}{bx}}$ )] свидетельствуют о значительных различиях между разными отделами мозга одного и того же вида животных и в аналогичных отделах мозга разных видов животных (табл. 2).  $K_{\frac{ax}{bx}}$  выше всего в отделах мозга коров (особенно в хвостатом теле), хвостатом теле остальных животных и мозгу крыс. Как правило,  $K_{\frac{ax}{bx}}$  значительно снижается в промежуточном, среднем и продолговатом отделах мозга. У собак, например,  $K_{\frac{ax}{bx}}$  в промежуточном и среднем отделах мозга равен 1.

Таблица 2

Молярные отношения активности по АХ к активности по БХ

( $K_{\frac{ax}{bx}}$ ) в разных отделах мозга животных

Вид животного	Большие полушария	Промежуточ. мозг	Хвостатое тело	Средний мозг	Мозжечек	Продолг. мозг
Кролики	3,8	2,0	9,3	2,3	5,0	2,5
Кошки	1,8	1,7	9,5	1,8	3,3	1,7
Крысы *	8,5	—	—	—	—	—
Коровы	13,0	8,3	32,0	10,0	4,8	5,7
Олени (возраст 5 месяцев)	3,7	—	23,2	—	2,2	—
Олени (возраст 2 года)	2,5	—	17,3	—	1,3	—
Собаки	2,1	1,0**	5,4	—	5,5	1,3

\* Мозг брался целиком, кроме мозжечка и продолговатого мозга.

\*\* Для промежуточного и среднего мозга.

## 2. О наличии в мозгу и органах животных БХЭ и оценка ее доли в гидролизе бутирилхолина и доли ЛХЭ в гидролизе ацетилхолина.

С помощью специфических ингибиторов и субстратов нам удалось установить наличие БХЭ в мозгу и органах собак, кошек, кроликов и крыс (у других видов животных не определяли). Для примера в табл. 3 приведены данные с использованием ингибитора 62С47.



Таблица 3

Влияние различных концентраций 62С47 на активность АХЭ и ЛХЭ некоторых отделов мозга собак (Инкубация с ингибитором 60 мин. Активность ХЭ в мкМ субстрата, разлагаемого 10 мл пробы в час при 37°C и рН 7,8)

№№ пп.	Отдел мозга	Концент- рация 62С47 в М	Активность ХЭ			Мини- мальная доля (в %) ЛХЭ в гидро- лизе АХ	Мини- мальная доля (в %) БХЭ в гидро- лизе БХ
			АХ	БХ	МХ		
1	Большие полушария	0,0	82	42	32	—	—
		$2,5 \cdot 10^{-6}$	21	39	0	26	—
		$4 \cdot 10^{-4}$	0	15,5	0	—	37
2	Большие полушария	0,0	73	48	29	—	—
		$5 \cdot 10^{-6}$	13,6	43,5	0	19	—
		$1 \cdot 10^{-3}$	0	15,1	0	—	31
3	Мозжечек	0,0	96	152	38,5	—	—
		$5 \cdot 10^{-6}$	12,7	137	0	14	—
		$2 \cdot 10^{-3}$	0	43	0	—	28
4	Средний и проме- жуточный мозг	0,0	82	103	31,4	—	—
		$5 \cdot 10^{-6}$	26	26	0	32	—
		$2 \cdot 10^{-3}$	0	15,4	0	—	15

Его концентрации  $(2,5—5,0) \cdot 10^{-6}$  М вызывали полное торможение активности АХЭ и незначительно угнетали активность ЛХЭ (активность по БХ снижалась на 5—10%). Поэтому рассчитанная доля участия ЛХЭ в гидролизе АХ является несколько меньше фактической, т. е. это минимально возможная доля. Она, вероятно, на 5—10% ниже фактической. Повышение концентрации 62С47 до  $(0,4—2,0) \cdot 10^{-3}$  М обуславливает полное торможение активностей АХЭ и ЛХЭ, а остающаяся активность по БХ приходится на минимально возможную долю БХЭ в гидролизе БХ.

Примерно такие же величины БХЭ и ЛХЭ были получены при использовании некоторых необратимых специфических ингибиторов. На основании этих данных рассчитаны средние значения минимально возможной доли ЛХЭ в гидролизе АХ и доли БХЭ в гидролизе БХ (табл. 4).

Результаты наших исследований о величине гидролиза ЛХЭ АХ совпадают с пока еще разрозненными результатами других авторов (11, 12). Бесспорно, эти данные нельзя рассматривать как окончательные и в дальнейшем они будут уточняться. Одно только несомненно: БХЭ присутствует во всех изученных

Активность АХЭ и ЛХЭ (субстрат АХ) и активность ЛХЭ и БХЭ (субстрат БХ) разных отделов мозга и органов животных. (Средние данные в Е активности на г влажной ткани. Инкубация с 62С47 1 час, с другими ингибиторами — 2 часа при 37°C. Инкубация с субстратами 1 час при 37°C и рН 7,8)

Источник ХЭ	Собаки				Кошки				Кролики				Крысы			
	по АХ		по БХ		по АХ		по БХ		по АХ		по БХ		по АХ		по БХ	
	АХЭ	ЛХЭ	ЛХЭ	БХЭ	АХЭ	ЛХЭ	ЛХЭ	БХЭ	АХЭ	ЛХЭ	ЛХЭ	БХЭ	АХЭ	ЛХЭ	ЛХЭ	БХЭ
Большие полушария	1,58	0,37	0,62	0,28	3,08	0,68	1,35	0,67	8,00	2,60	1,10	1,60	9,00	1,10	0,83	0,37
Хвостатое тело	29,3	6,70	3,67	3,00	44,00	3,83	2,54	2,50								
Средний и промежут. мозг	3,14	1,35	3,36	1,12	6,68	2,00	3,00	2,00								
Мозжечок	5,95	0,67	0,87	0,33	13,60	1,36	2,48	2,00								
Продолгов. мозг	3,19	1,16	2,24	0,95	—	—	—	—								
Сердце	0,08	0,33	0,77	0,33	0,37*	—	0,30	0,20	0,83*	—	0,65	0,40				
Легкое	0,15	0,50	0,87	0,30	1,43*	—	1,60	0,40								
Почки	—	0,80	2,48	0,98	—											
Селезенка	0,55	0,22	2,16	0,80					3,36*	—	0,42	0,12	2,48*	—	0,88	0,38
Печень	—	11,50	49,50	4,30					0,96	0,00	0,00	1,80				
Желудок	0,10	0,33	0,40	0,15	—											
Кишечник тонкий	0,30	1,06	3,54	0,72	—											
Поджелу- дочн. железа					1,58	—	1,13	0,30								

\* Суммарная активность АХЭ и ЛХЭ.

отделах мозга и органах собак, кошек, кроликов и крыс и она значительно лучше гидролизует бутирилхолин, чем бензоилхолин. Наличие БХЭ показано в опытах *in vivo* в сердце отравленных ТИППФ кошек (см. табл. 5). Обращает на себя внимание одна примечательная особенность: активность АХЭ (в молях гидролизуемого субстрата) в отделах мозга в 3—20 раз превышает активность БХЭ, тогда как во внутренних органах картина обратная. Характерно, что в ряде отделов мозга на долю БХЭ в гидролизе БХ приходится от 45 до 60% (большие полушария кроликов, мозжечек кошек, хвостатое тело собак и кошек), в сердце животных — от 30 до 50%, а в печени кроликов — даже 100%. В печени кроликов кроме БХЭ присутствует АХЭ, а ЛХЭ или отсутствует, или ее количество ничтожно.

Наши данные о наличии БХЭ в мозгу крыс хорошо согласуются с наблюдениями Шут и Левис (33), установивших гистохимически присутствие клеток, гидролизующих исключительно бутирилтиохолин. То же самое недавно показал Павлин (34) на единичных клетках, выделенных из ретикулярной формации крыс. В нашем институте Н. В. Владеева гистохимическим методом подтвердила наличие БХЭ в мозгу кошек (неопубликованные данные).

### 3. О роли холинэстераз.

Логично допустить, что в организме животных наряду с ацетилхолинореактивной системой существует бутирилхолинореактивная. Это следует из того, что холинацетилаза способна синтезировать бутирилхолин (3), который был найден в мозгу крыс (35, 36). Бутирилхолин обладает холинолитическим действием (35—37) и он преимущественно возбуждает н-холинорецепторы (38). БХЭ имеется в мозгу и органах животных и обладает высокой активностью каталитического центра (АКЦ). Путем титрования активных центров БХЭ и ЛХЭ мозга кошек высокоизбирательным ингибитором нами была рассчитана АКЦ при  $I_{50}$ . Для БХЭ она равна  $(4—6) \cdot 10^6$  (субстрат БХ, 37°C, рН 7,8), а для ЛХЭ —  $(2—4) \cdot 10^6$  (условия те же). АКЦ этих ферментов равнозначна АКЦ АХЭ (субстрат АХ, 37°C, рН 7,8). Перед нами стоит задача доказать наличие бутирилхолинорецепторов, выяснить функциональную роль этой системы и определить ее взаимосвязь с ацетилхолинореактивной системой.

Роль ЛХЭ в мозгу, как мы полагаем, состоит в защите АХЭ от тормозящего действия на нее БХ, концентрация которого в определенных условиях может значительно увеличиваться. Основанием этого предположения служат следующие данные. Коэн с сотр. (37) показали тормозящее влияние бутирилхолина на ХЭ



мозга кролика. В опытах *in vitro* нами установлено, что бутирилхолин в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-3}$  М тормозит на 53—81% способность больших полушарий, хвостатого тела, мозжечка, скелетных мышц и эритроцитов коров, кошек, кроликов и крыс гидролизовать АХ. В 5 раз меньшие концентрации БХ тормозят на 17—32%, а в 10 раз меньшие — на 3—25%. Не исключено также тормозящее действие избытка АХ на БХЭ, что требует специальной проверки. Токсичность БХ при внутримышечном введении крысам, с полностью подавленной активностью БХЭ и ЛХЭ мозга и органов и незначительном угнетении активности АХЭ (ингибитор вводили за два часа до медиатора), по сравнению с контролем возрастала в 55 раз, а токсичность АХ — лишь в 6,9 раза (для контрольных крыс ЛД<sub>50</sub> бутирилхолин-йодида —  $884 \pm 64$  мг/кг, а ацетилхолинхлорида —  $152 \pm 13$  мг/кг). ЛХЭ имеется почти всюду, где присутствует АХЭ и БХЭ (см. табл. 1 и 4). При эмбриональном развитии котят увеличение активности АХЭ, ЛХЭ (и БХЭ) происходит параллельно. У животных, после угнетения активности ХЭ необратимыми ингибиторами, их синтез начинается почти одновременно.

До сих пор остается загадочной роль внесинаптической АХЭ. ЛХЭ крови и кишечника и, вероятно, все три ХЭ мозга и органов участвуют в гидролизе эфиров холина и в какой-то степени низкомолекулярных нехолиновых эфиров экзогенного и эндогенного (помимо синаптического) происхождения. Дискуссион-

Активность ХЭ в разных тканях кошек в норме и через одни и четверо суток зилом (инкубация ткани с субстратом)

Условная постановка опыта (№ серии)	Вид холинэстеразы	Субстрат	К-во животных	эритроциты
Норма (I)	АХЭ АХЭ-ЛХЭ ЛХЭ-БХЭ	МХ АХ БХ	6	$0,20 \pm 0,04$ $0,44 \pm 0,06$ $0,04 \pm 0,01$
Через сутки после введения ТИППФ (II)	АХЭ АХЭ-ЛХЭ ЛХЭ-БХЭ	МХ АХ БХ	6	0,000 0,000 —
Через четверо суток после введения ТИППФ (III)	АХЭ АХЭ-ЛХЭ ЛХЭ-БХЭ	МХ АХ БХ	5 $\begin{bmatrix} 3 \\ 2 \end{bmatrix}$	— $\begin{bmatrix} 0,000 \\ 0,014 \end{bmatrix}$ —

ной остается проблема существования других холинэстераз, преимущественно гидролизующих эфиры пропионилхолина, АХ и других (4).

#### 4. О месте синтеза холинэстераз мозга и органов.

Приводится ряд доказательств о синтезе ЛХЭ плазмы печени (6, 21). Однако нам встретился один кролик, в печени которого была только одна АХЭ. В других же тканях — в сердце, селезенке, мозгу, крови — активность по бутирилхолину не отличалась от нормы. Встает вопрос: где же синтезировалась ЛХЭ крови этого кролика? Джемисон (23) допускает образование ЛХЭ в кишечнике, но доказательств не приводит.

В наших экспериментах появилась возможность судить о месте синтеза АХЭ мозга и органов. Опыты проводили на кошках. Им вводили абсолютно смертельную дозу ТИППФ (в/м — 1,3 мг/кг), и на фоне появившихся судорог инъецировали амизил (в/м — 3,0 мг/кг), который спасал от гибели 75% животных. Одну часть выживших животных умерщвляли через сутки, другую — через четверо суток после введения яда. У них и у контрольных кошек измеряли активность ХЭ тканей, как описано в методике. Для измерения активности ХЭ в костном мозге его по возможности полностью извлекали из трубчатых костей пе-

Таблица 5

после отравления тетразиопропилпирофосфатом (ТИППФ) и лечения ами-60 мин. при 37°C и рН 7,8)

Единиц активности на г влажной ткани ( $M \pm m$ )					
плазма	большие полушария мозга	костный мозг	сердце	селезенка	печень
0,000 0,85±0,08 2,70±0,20	1,66±0,12 3,76±0,15 2,05±0,19	0,59±0,08 0,97±0,12 0,39±0,04	0,08±0,01 0,37±0,03 0,52±0,03	1,34±0,18 2,98±0,32 0,73±0,09	0,000 1,46±0,36 3,60±0,78
— 0,06±0,016 0,21±0,005	0,24±0,036 0,41±0,060 0,08±0,005	0,08 0,13±0,05 0,00	0,000 0,000 0,008	0,010 0,013 0,000	— 0,056 0,33±0,06
— 0,27±0,02 0,79±0,08	0,54±0,05 0,82±0,04 0,32±0,03	0,53±0,09 0,90±0,14 0,03±0,007	0,000 0,004 0,051	0,53±0,04 1,05±0,06 0,012	— 0,38±0,07 0,98±0,20

редних и задних конечностей. Затем из него ХЭ полностью экстрагировали водой (40). Через 2—3 часа после введения кошкам ТИППФ активность ХЭ крови угнеталась полностью. Нацело была подавлена и активность ХЭ костного мозга спустя 7—10 часов после отравления. В это же время в крови и костном мозге находили яд в свободной форме, но уже через сутки его обнаружить не удавалось (40). Через сутки у отравленных кошек (табл. 5) наблюдалось полное угнетение активности АХЭ и ЛХЭ эритроцитов и сердца и активности по БХ костного мозга и селезенки. Выявлялась очень слабая активность АХЭ в селезенке и активность по БХ в больших полушариях и сердце. Наибольшая активность АХЭ была в больших полушариях и костном мозге (11—14% от нормы) и активность ЛХЭ — в печени и плазме (4—9%).

Ввиду того, что ТИППФ является необратимым ингибитором ХЭ, обнаруживаемая в костном мозге и плазме ферментативная активность происходит за счет синтеза ХЭ. В последующие трое суток новообразование ХЭ идет в разных органах отравленных кошек по-разному. Прежде всего поражает колоссальная скорость синтеза АХЭ в костном мозге. В противоположность установившемуся мнению (1, 3, 7), что АХЭ синтезируется весьма медленно ( $\sim 1\%$  в сутки), мы наблюдали в костном мозге прирост активности со скоростью 25% в сутки. Со значительными скоростями шел синтез АХЭ в селезенке и в больших полушариях мозга (8—6% в сутки). Напротив, в сердце (у всех 5 кошек) и по известной причине в эритроцитах крови (40) АХЭ на третьи (у 5 кошек) и четвертые (у 3 из 5 кошек) сутки после введения ТИППФ отсутствовала. Отсутствие АХЭ в сердце вызвано, возможно, малой скоростью ее синтеза. Конечно, нельзя исключить и тормозящего действия избытка субстрата (мехолин) на малую активность фермента.

В скорости восстановления активности ЛХЭ (по БХ) также имеются существенные различия. В печени и плазме происходит параллельное нарастание активности (6—7% в сутки), с меньшей, но сравнительно одинаковой скоростью идет увеличение в больших полушариях мозга, костном мозге и сердце (4,0—2,5%) и очень медленно — в селезенке ( $\sim 0,5\%$  в сутки).

Примечательно, что активность АХЭ в эритроцитах кровеносного русла, обработанных ТИППФ кошек, начинает появляться только после полного восстановления активности АХЭ в костном мозге (видимо, это в основном АХЭ созревающих эритроцитов). Наличие корреляции между АХЭ костного мозга и АХЭ эритроцитов крови лишний раз подтверждает мнение о том, что эритроциты в селезенке не образуются.

Различия скоростей новообразования АХЭ в органах и от-



сутствие АХЭ в крови в течение 3—4 суток после введения ТИППФ и тем самым отсутствие возможного ее переноса из мест синтеза в тот или иной орган позволяют сделать вывод: АХЭ синтезируется самими тканями мозга и органов. Быть может и БХЭ, и ЛХЭ также синтезируются там же. Исключение представляет только кровь, ХЭ которой образуются или в костном мозге (АХЭ), или в печени и кишечнике (ЛХЭ и БХЭ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков С. Н., Розенгарт В. И., Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. М., 1964.
2. О'Брайн Р., Токсичные эфиры кислот фосфора, М., 1964.
3. Nachmansohn D., Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity. Acad. Press, N. Y. a. L., 1959.
4. Augustinsson K. B., Handbuch der Exp. Pharmacol., 15, Ch. 4, S. 91, 1963.
5. Köelle G. B., Handbuch der Exp. Pharmacol., 15, 187, 1963.
6. Gerebtzoff M. A., Cholinesterases. Perg. Prass. L., 1959.
7. Bernsohn, Neurology, 8, 94, 1958.
8. Португалов В. В., Яковлев В. А., Вопросы мед. химии, 5, 188, 1953.
9. Boylis B. J., Todrick, Biochem. J., 62, 62, 1956.
10. Ord M. G., Thompson R. H. S., Biochem. J., 51, 245, 1952.
11. Davison A. N., Biochem. J., 54, 583, 1953.
12. Foldes F. F., Elmar K. Z., Foldes V. M., J. Neurochem., 9, 559, 1962.
13. Sowyer C. H., Science, 101, N 2624, 1945.
14. Gunter J. M., Nature, 157, 369, 1946.
15. Blaschko H., Chon T. L., Waide J., Brit. J. Pharmacol., 2, 108, 1947.
16. Ellis S., Sonders S., Bodansky O., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 91, 255, 1947.
17. Köelle G. B., Biochem. J. 53, 217, 1953.
18. Панюков А. Н., Вопросы мед. химии, 12, 88, 1966.
19. Lehmann H., Liddell J., Modern Trends in Anaesthesia, L., ch. 8, 1961.
20. Панюков А. Н., Доклад на обществе биохимиков Ленинграда, 1963 г. Тезисы докладов Первого Всесоюзн. биохим. съезда, в 2, доп. засед. 1—9, стр. 134, 1964.
21. Clitherow J. W., Mitchard M., Harper N. I., Nature, 199, 1000, 1963.
22. Köelle G. B., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 114, 167, 1955.
23. Jamieson D., Biochem. Pharmacol., 12, 693, 1963.
24. Earl C. I., Thompson R. H. S., Brit. J. Pharmacol., 7, 261, 685, 1952.
25. Bidstrup P. L., Hunter D., Brit. med. J., 1, 277, 1952.
26. Howkins R. D., Mendel B., Biochem. J., 44, 260, 1949.
27. Blaschko H., Bülbring E., Chon T. L., Brit. J. Pharmacol., 4, 29, 1949.
28. Shelley H., Brit. J. Pharmacol., 10, 26, 1955.
29. Sargener D. M., Ellis D., J. Amer. Chem. Soc., 76, 6049, 1954.
30. Holmstedt B., Sjöqvist F., Biochem. Pharmacol., 3, 297, 1960.
31. Hestrin S., J. Biol. Chem., 180, 249, 1949.
32. Ткаченко А. В., Вопросы мед. химии, 9, 71, 1963.
33. Schute C. C. D., Lewis R. B., Nature, 199, 4899, 1963.

34. Pavlin R., J. Neurochem., 12, 515, 1965.
35. Hosein E. A., Proulx., Ara R., Biochem J., 83, 341, 1962.
36. Holtz P., Schumann H., Naturwissenschaften, 41, 306, 1954.
37. Choen J. A., Warringa M. G. P. I., Bovens B. R., Biochim. Biophys. Acta, 6, 469, 1951.
38. Зеймаль Э. В., Вульфius Е. А., Тезисы докладов к научной конференции «Связь фармакологической активности лекарственных веществ с их физико-химическими свойствами». Л., стр. 31, 1966.
39. Яковлев В. А., Кинетика ферментативного катализа. 1965.
40. Панюков А. Н., Биохимия (в печати).

## НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

З. Д. Пигарева, А. С. Камышева

Лаборатория биогистохимии Института мозга АМН СССР, Москва

Естественно полагать, что развитие мозга в онтогенезе должно коррелировать с изменением окислительной активности митохондрий как энергетических центров клетки. На основании изучения дыхательной активности митохондрий целого мозга крыс (1, 2) было сделано заключение, что повышение энергетических «запасов» в развивающемся мозгу базируется в большей мере на увеличении числа митохондрий, чем на изменении их размеров и состава. При этом авторы допускают возможность наличия отдельных популяций митохондрий, имеющих особое значение в повышении химической активности мозга. Нами была сделана попытка подойти к решению этого вопроса путем сравнения фракций митохондрий коры больших полушарий и ствола мозга как образований, отличающихся по структурной композиции и выполняемой функции.

Изучались препараты митохондрий указанных частей мозга крольчат в возрасте 1, 5, 15, 30 суток и половозрелых кроликов, выделяемые в стандартных условиях при помощи дифференциального центрифугирования по несколько измененной методике Фоньо и Шомодьи (3). Процедура выделения описана нами ранее (4). Качество полученных суспензий митохондрий контролировали на электронном микроскопе типа УЭМБ-100 (рис. 1). Подсчет митохондрий вели в фазово-контрастном микроскопе, применяя камеру Горяева. Содержание белков в препаратах митохондрий определяли по методу Лоури (5). Биохимические свойства митохондрий оценивались по интенсивности процессов дыхания, окислительного фосфорилирования и степени их сопряженности, по активности цитохромоксидазы (цитохром-с:  $O_2$ -оксидоредуктаза, МКФ 1.9.3.1), сукцинатдегидрогеназы (сукцинат-цитохром-с-оксидоредуктаза, МКФ 1.3.99.1), (манометрические методы), а также по концентрации цитохромов а и с + с<sub>1</sub>,



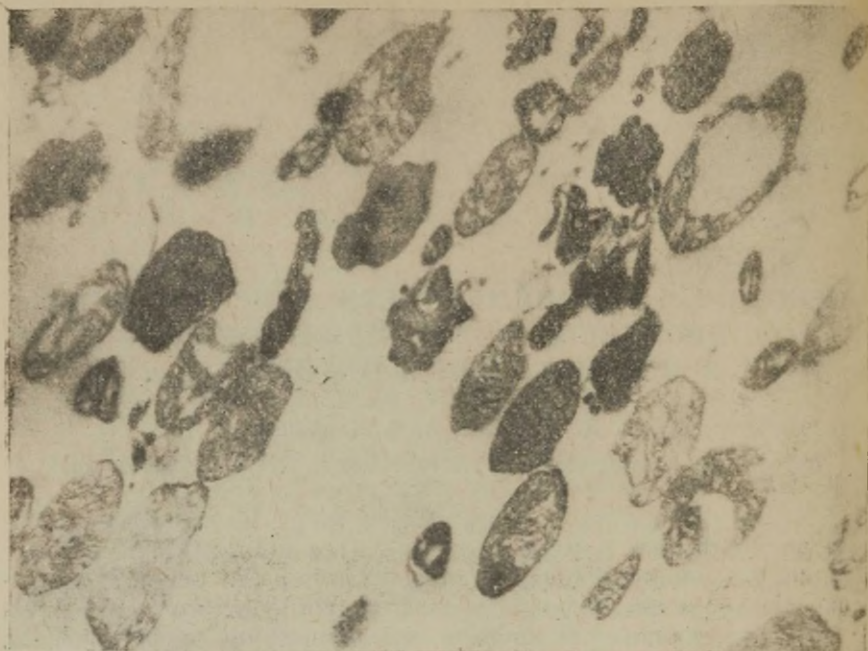


Рис. 1. Электронограмма фракции митохондрий коры мозга взрослого кролика. Увеличение 40 000  $\times$ . Фиксация  $\text{OsO}_4$ .

определяемой спектрофотометрически (4). Кроме того, по методу Клилэнда (6) изучалось изменение оптической плотности суспензий митохондрий — их набухание под влиянием дезокси-холата натрия ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  М) и трипсина (1 мг/мл), что в известной мере позволяло судить об изменении свойств белково-липидных компонентов мембран митохондрий в процессе развития мозга.

Для измерения интенсивности дыхания применялась инкубационная смесь, состоящая из следующих компонентов в конечной концентрации их: 0,05 М  $\text{KCl}$ ; 0,008 М  $\text{MgCl}_2$ ; 0,012 М триоксиметиламинометана (трис); 0,025 М фосфатного буфера pH 7,2; 0,01 М  $\text{NaF}$ ; 0,002 М АДФ; 0,05 М глюкозы и гексокиназы — 4 мг на пробу (*Lawson, L. T. D.*). Субстратами дыхания служили 0,01 М глутаминовая и янтарная кислоты. После 20-минутной регистрации поглощения кислорода при  $26^\circ\text{C}$  белки осаждали трихлоруксусной кислотой и в центрифугате определяли убыль неорганического фосфора по методике Эннора и Розенберга (7). Для определения активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы использовали методики Шнейдера и Поттера (8).

Окислительная активность митохондрий мозга кролика  
в мкл О(Р) на мг белка в час

Возраст в сутках	Количество животных	Митохондрии						Митохондрии					
		коры			ствола			коры			ствола		
		Субстрат — глутаминовая кислота						Субстрат — янтарная кислота					
		ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O	ΔO	ΔP	P/O
1	6	1,50 ±0,19	3,28 ±0,43	2,19 ±0,15	1,25 ±0,20	2,78 ±0,49	2,22 ±0,22	1,98 ±0,37	2,53 ±0,34	1,28 ±0,15	1,55 ±0,18	2,20 ±0,30	1,42 ±0,21
5	6	0,89 ±0,078	2,24 ±0,19	2,52 ±0,18	1,19 ±0,31	2,68 ±0,42	2,25 ±0,27	1,35 ±0,33	1,94 ±0,31	1,44 ±0,10	1,51 ±0,23	2,38 ±0,66	1,57 ±0,23
15	8	1,17 ±0,18	3,08 ±0,56	2,63 ±0,18	1,06 ±0,10	2,41 ±0,20	2,27 ±0,15	1,52 ±0,22	2,15 ±0,40	1,41 ±0,09	1,36 ±0,33	2,25 ±0,41	1,66 ±0,03
30	6	1,52 ±0,21	3,87 ±0,60	2,46 ±0,12	1,21 ±0,41	2,99 ±0,96	2,47 ±0,22	1,60 ±0,50	2,47 ±0,80	1,56 ±0,06	1,63 ±0,50	2,52 ±0,80	1,54 ±0,16
Взрослые	10	1,36 ±0,10	3,30 ±0,34	2,42 ±0,12	1,10 ±0,10	2,50 ±0,30	2,28 ±0,32	1,99 ±0,31	3,24 ±0,48	1,63 ±0,08	1,68 ±0,15	2,68 ±0,27	1,60 ±0,06

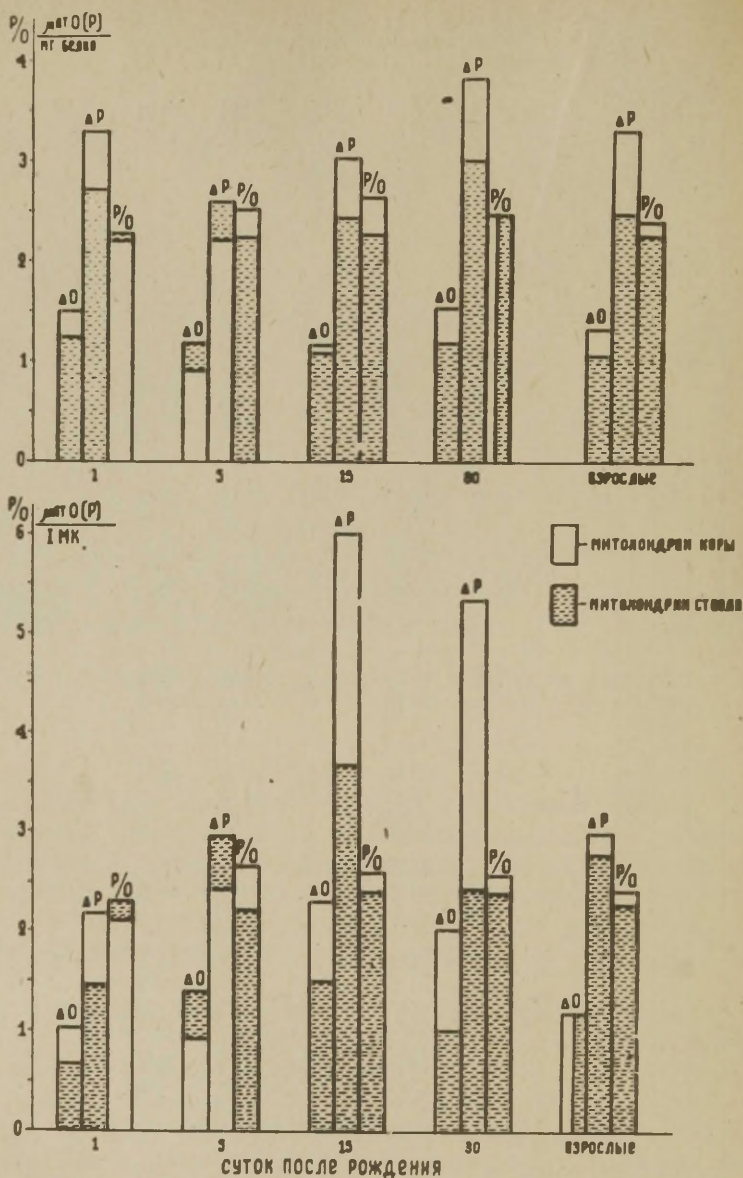


Рис. 2. Окислительная активность митохондрий мозга кролика в постнатальном онтогенезе. Субстрат—глутамат.

По оси абсцисс — возраст в сутках. По оси ординат — величина  $P/O$ , интенсивность дыхания ( $\Delta O$ ) и окислительного фосфорилирования ( $\Delta P$ ) в микрограмм-атомах на мг белка митохондрий в час (верхний ряд столбцов) и на одну митохондрию (нижний ряд столбцов). Белые столбцы — митохондрии коры. Заштрихованные — митохондрии ствола.



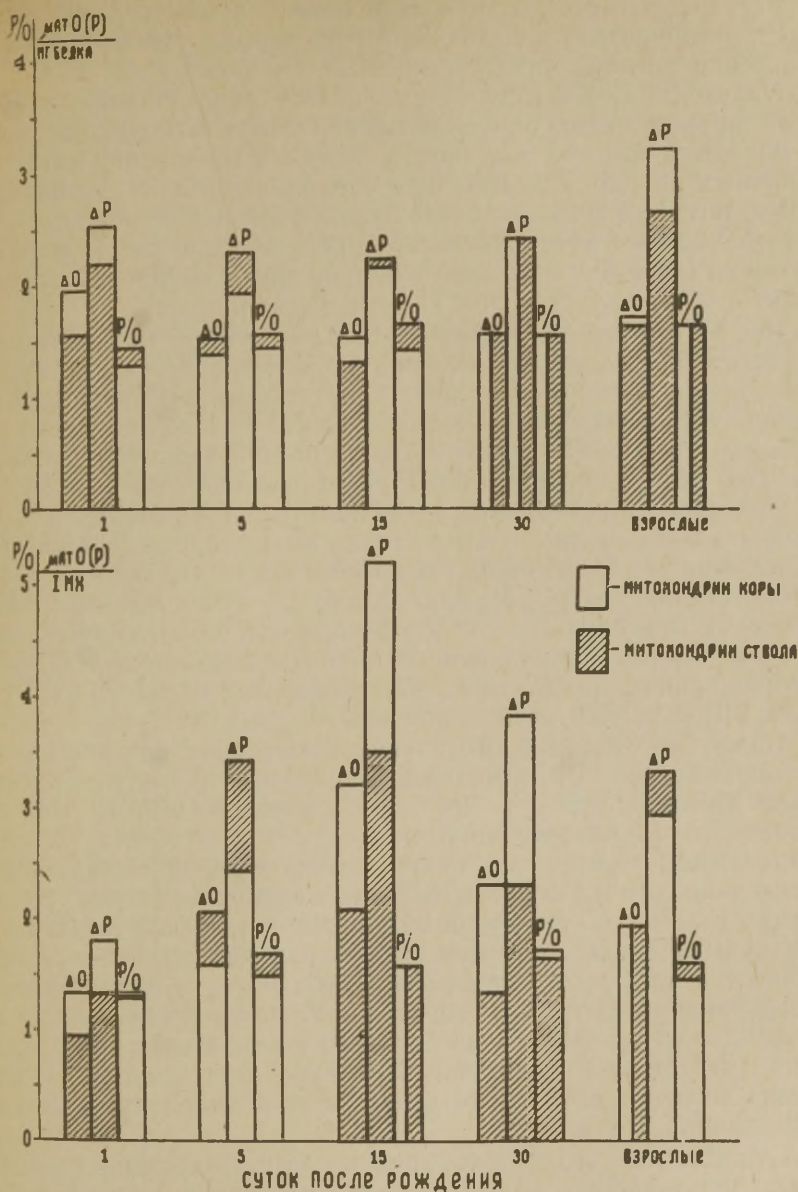


Рис. 3. Окислительная активность митохондрий мозга кролика в постнатальном онтогенезе. Субстрат — сукцинат. Обозначения те же, что и к рис. 2.

Результаты исследования выражались в микрограмм-атомах или в микролитрах поглощенного кислорода (фосфора) на мг белка или на одну митохондрию.

Переходя к изложению результатов исследования, необходимо, прежде всего, отметить значительную вариабильность величин интенсивности дыхания и фосфорилирования митохондриальных препаратов. Как правило, при высоком уровне дыхания, интенсивность окислительного фосфорилирования, а следовательно — и сопряженность, ниже, чем при среднем уровне дыхания. Наряду с этим, митохондрии могут сохранять высокую степень сопряженности при низком дыхании.

Все эти факты показывают, что, несмотря на соблюдение стандартных условий выделения, не всегда обеспечивается сохранность биохимических свойств митохондрий. Основные положения, высказываемые при дальнейшем изложении, будут касаться «сопряженных» митохондрий, поскольку структура митохондрий такого рода сохраняется относительно интактной.

Из данных, приведенных в таблице 1 и на рисунках 2 и 3, следует, что митохондрии коры и ствола мозга взрослого животного обнаруживают более высокую интенсивность дыхания, но такую же интенсивность фосфорилирования на сукцинате по сравнению с глутаматом. Величины Р/О при окислении глутаминовой кислоты выше, чем при окислении янтарной (соответственно в митохондриях коры и ствола Р/О равно 2,42 и 2,28 — на глутамате и 1,63 и 1,60 — на сукцинате).

Подобный характер соотношения окисления янтарной и глутаминовой кислот в митохондриях целого мозга (в основном крыс) отмечался и другими исследователями (9, 10—14). На основании данных, полученных нами, можно отметить, что окисление обоих субстратов в митохондриях коры происходит более интенсивно, чем в митохондриях стволовой части мозга. Е. Л. Доведова (11) отметила подобный факт при изучении митохондрий различных образований мозга взрослых кошек. Такая «специфичность» метаболизма отдельных субстратов в митохондриальных фракциях из разных образований мозга расценивается нами не только как показатель разного соотношения в этих фракциях митохондрий нейронов и глиальных клеток, но и как показатель отличий свойств этих органелл в нейронах отдельных образований мозга.

Существенно, что митохондрии мозга новорожденного животного характеризуются почти таким же уровнем дыхания и фосфорилирования, как митохондрии мозга взрослого животного, однако сопряженность этих процессов в них ниже.

В митохондриях 5-суточных кроликов интенсивность процессов дыхания и фосфорилирования значительно ниже, чем у взрослых кроликов. Начиная с пятых суток окислительная активность митохондрий увеличивается. В период 5—30 суток со-

пряженность процессов дыхания и фосфорилирования равна или несколько выше (на глутамате) таковой в митохондриях взрослых животных. В это же время обнаруживаются отличия в характере окисления исследованных субстратов в митохондриях коры по сравнению с митохондриями ствола мозга. Митохондрии коры окисляют глутаминовую кислоту более активно, чем янтарную. В митохондриях мозга 30-дневного кролика интенсивность дыхания и фосфорилирования при использовании глутаминовой кислоты превышает таковую в митохондриях взрослого мозга. При окислении янтарной кислоты такого превышения не наблюдается.

Приведенные данные характеризовали дыхательную и фосфорилирующую активность митохондриальной массы на единицу (мг) ее белка.

Однако по мере созревания мозга содержание белков на одну митохондрию изменяется. Наименьшее количество этих веществ — в митохондрии мозга новорожденных; наибольшее — в митохондрии мозга 15—30-дневных и среднее — у взрослых кроликов (4).

В связи с этими данными представляло интерес рассчитать окислительную активность на одну митохондрию. Результаты такого расчета приведены графически на рис. 2 и 3. Можно видеть, что, несмотря на большую дыхательную активность митохондриального белка мозга новорожденных животных, каждая «средняя» митохондрия уступает в этом отношении митохондрии созревшего мозга. На всех исследованных возрастах в митохондриях сохраняются основные закономерности окисления отдельных субстратов. Отличия между митохондриями коры и ствола по интенсивности окислительных процессов на обоих субстратах окисления выражены более резко, чем при отнесении соответствующих величин к мг белка.

Таким образом, окислительная активность митохондрий мозга в процессе развития закономерно изменяется. Особенности окисления глутаминовой и янтарной кислот, отмеченные для митохондрий взрослого кролика, присущи этим органеллам с первых дней после рождения.

Как указывалось выше, в препаратах митохондрий нами определялась активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы.

Результаты определений, приведенные в таблице 2, показывают, что в процессе развития мозга активность этих ферментов в митохондриях закономерно изменяется. В митохондриях коры и ствола новорожденных кроликов активность цитохромоксидазы (на мг белка) составляет соответственно 51 и 84%, а сукцинатдегидрогеназы — 94 и 61% от «взрослого» уровня. К 60-м суткам активность цитохромоксидазы становится такой же, как в митохондриях взрослого животного. В отношении ак-



Таблица 2

Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях мозга кроликов

Возраст в сут- ках	Коли- чество жи- вот- ных	Цитохромокси- даза		Сукцинат- дегидроге- наза		Цитохром- оксидаза		Сукцинат- дегидрогеназа	
		мкл O <sub>2</sub> /мг белка в час				мкл O <sub>2</sub> /l МХ в час 10 <sup>-9</sup>			
		Митохондрии				Митохондрии			
		коры	ствола	коры	ствола	коры	ствола	коры	ствола
1	6	187,0 ±51,2	256,0 ±29,5	28,5 ±6,1	24,7 ±6,0	238,00 ± 72,0	215,00 ± 52,0	49,00 ± 11,0	47,00 ± 14,0
5	5	305,0 ±30,4	309,0 ±22,4	39,2 ±9,5	45,5 ±2,3	261,00 ± 33,0	311,00 ± 31,0	78,00 ± 14,0	44,00 ± 12,0
15	9	305,0 ±38,6	225,0 ±23,5	28,6 ±7,3	28,2 ±3,2	326,00 ± 27,0	234,00 ± 24,0	45,00 ± 4,0	32,00 ± 7,0
30	7	163,0 ±18,5	185,0 ±19,8	33,6 ±7,7	41,2 ±8,1	233,00 ± 24,0	246,00 ± 12,0	54,00 ± 14,0	51,00 ± 8,0
60	8	362,0 ±57,4	361,0 ±84,0	35,6 ±4,3	45,4 ±6,7	250,00 ± 36,0	279,00 ± 48,0	27,00 ± 6,0	32,00 ± 10,0
Взрос- лые	6	361,0 ±29,5	309,0 ±51,7	30,4 ±6,9	40,4 ±8,9	207,00 ± 37,0	194,00 ± 32,0	25,00 ± 5,0	36,00 ± 8,0

тивности сукцинатдегидрогеназы достижение «взрослого» уровня отмечается раньше — к 30-му дню.

Существенно, что динамика изменений активности исследованных ферментов в митохондриях мозга в процессе его развития не совпадает полностью с динамикой изменения процессов дыхания и фосфорилирования в целом.

По нашим данным, митохондрии новорожденного кролика содержат такие же компоненты цепи переноса электронов (ЦПЭ), как митохондрии взрослых, но в более низкой концентрации (4). Таким образом, формирование дыхательной цепи митохондрий мозга кроликов происходит еще в эмбриональном периоде, что соответствует и результатам изучения окислительной активности митохондрий мозга куриных эмбрионов (13, 16). В процессе развития мозга содержание компонентов ЦПЭ нарастает. В течение 1—120-х суток митохондрии коры мозга отличаются по этому показателю от митохондрий ствола.

Эти данные были использованы для расчета «молекулярной активности» (число оборотов) цитохромов а и с + с<sub>1</sub> (число молей субстрата, окисляемого на один моль цитохрома за 1 час). Соот-



Рис. 4. «Молекулярная активность» цитохромов а и  $c + c_1$  в митохондриях мозга кролика в постнатальном онтогенезе. Субстраты — глутамат и сукцинат.

По оси абсцисс — возраст в сутках. По оси ординат — количество молей субстрата (глутамата или сукцината), окисляемых на моль цитохрома (а или  $c + c_1$ ) за час. Белые столбики — митохондрии коры, заштрихованные — митохондрии ствола.

ветствующие результаты приведены графически на рис. 4. Можно видеть, что активность обоих цитохромов в отношении сукцината выше, чем в отношении глутамата. Причем в митохондриях коры эти цитохромы активнее, чем в митохондриях ствола. Активность цитохромов  $c + c_1$  превосходит таковую цитохрома а. В митохондриях развивающегося мозга биологическая активность обоих цитохромов выше, чем в митохондриях мозга взрослого животного.

Ранее Сектор и Паккер (14) отметили, что «число оборотов» цитохрома при окислении янтарной кислоты значительно выше, чем при окислении глутаминовой. Подтверждая этот факт, полученные нами данные свидетельствуют, что по мере развития мозга и накопления в митохондриях цитохромов биологическая активность последних уменьшается.

По-видимому, формирование цепи переноса водорода и электронов в митохондриях мозга в процессе развития происходит коррелировано по всем ее участкам. Об этом свидетельствуют данные, графически приведенные на рис. 5, показывающие, что молекулярная активность цитохромов а и  $c + c_1$  меняется не только в отношении испытываемых субстратов, но и в отношении соответствующих ферментных систем.

Совокупность приведенных данных позволяет полагать, что митохондрии различных образований мозга, в частности, митохондрии коры больших полушарий и ствола мозга, на разных этапах развития отличаются между собой не только по концент-

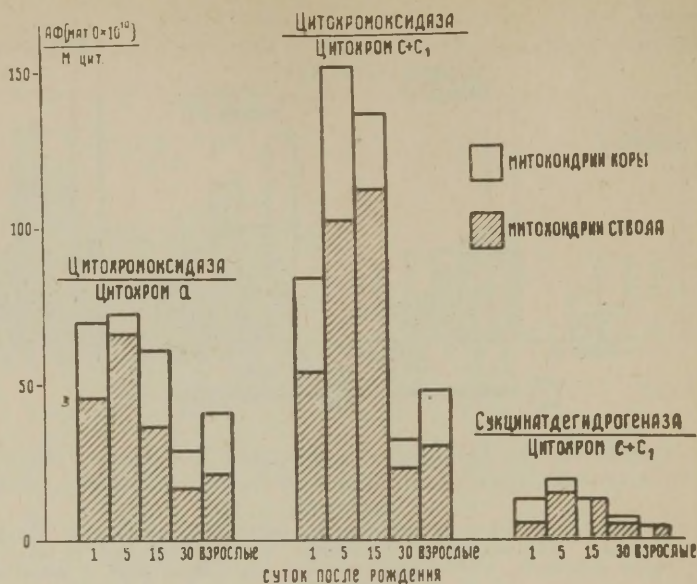


Рис. 5. «Молекулярная активность» цитохромов а и с + с<sub>1</sub> в ферментных системах.

По оси абсцисс — возраст в сутках. По оси ординат — молекулярная активность цитохрома а в системе цитохромоксидазы (1-я группа столбцов) и цитохромов с + с<sub>1</sub> в системе цитохромоксидазы (2-я группа столбцов) и сукцинатдегидрогеназы (3-я группа столбцов). Белые столбики — митохондрии коры. Заштрихованные столбики — митохондрии ствола.

рации, но и по биологической активности отдельных компонентов ЦПЭ, в частности, цитохромов а и с + с<sub>1</sub>. По-видимому, последняя в значительной мере определяет тот или другой уровень интенсивности окисления отдельных субстратов в определенных типах митохондрий.

По современным представлениям существенное значение для эффективности ЦПЭ имеет композиция и структура митохондриальных мембран.

При исследовании митохондрий разных образований мозга взрослых животных было показано наличие коррелятивной связи между уровнем активности окислительных ферментов и свойствами белково-липидных компонентов мембран этих органелл (15).

Изменения концентрации и состава липидов в митохондриях, происходящие в процессе развития мозга, оказывают влияние на морфо-химические свойства митохондрий. Так, по нашим данным (рис. 6), по мере роста животного уменьшается степень изменения оптической плотности митохондрий мозга под влиянием



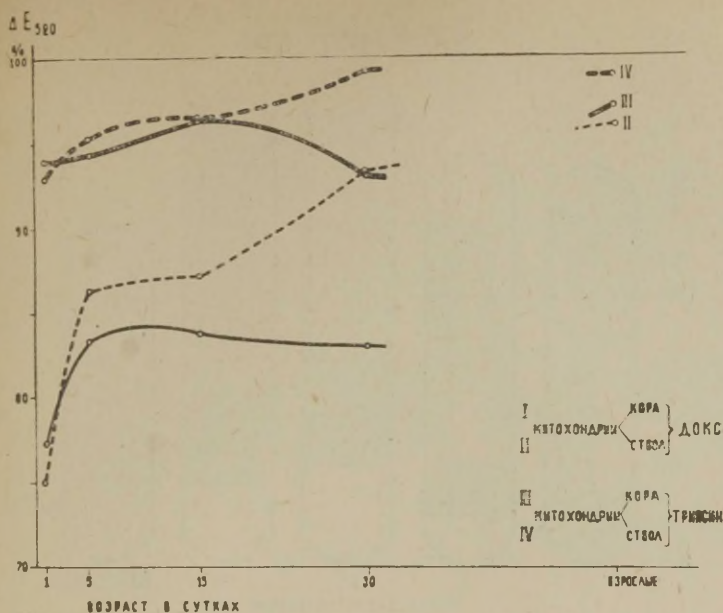


Рис. 6. Изменение оптической плотности митохондрий мозга под влиянием дезоксихолата натрия и трипсина у кроликов в постнатальном онтогенезе.

По оси абсцисс — возраст в сутках. По оси ординат — изменение оптической плотности в %, по сравнению с исходным уровнем её в интактных митохондриях. Сплошные линии — митохондрии коры. Прерывистые — митохондрии ствола. Жирные линии — действие дезоксихолата натрия — (I, II). Тонкие линии — действие трипсина (III, IV).

дезоксихолата натрия и трипсина. Наибольшей степенью набухания отличаются митохондрии мозга новорожденных животных. Особенно заметные изменения интенсивности набухания митохондрий происходят в период 15—30 суток. Эти изменения в митохондриях коры выражены более резко, чем в митохондриях ствола.

Приведенные данные свидетельствуют, что формирование структур мозга в процессе развития сопровождается изменением свойств липидно-белковых компонентов мембран митохондрий. Последнее определенным образом коррелирует с развитием активности ферментов, изменением биологической молекулярной активности цитохромов и окислительных процессов в целом.

Сведения о морфологии митохондрий мозга в процессе его развития противоречивы. Так, Абдель-Латиф и Эбуд (16) не обнаружили разницы в структуре митохондрий мозга эмбрионов и крысят при рассмотрении соответствующих фракций в электронном микроскопе, хотя гетерогенность этих фракций по составляющим их компонентам была отмечена. По данным дру-

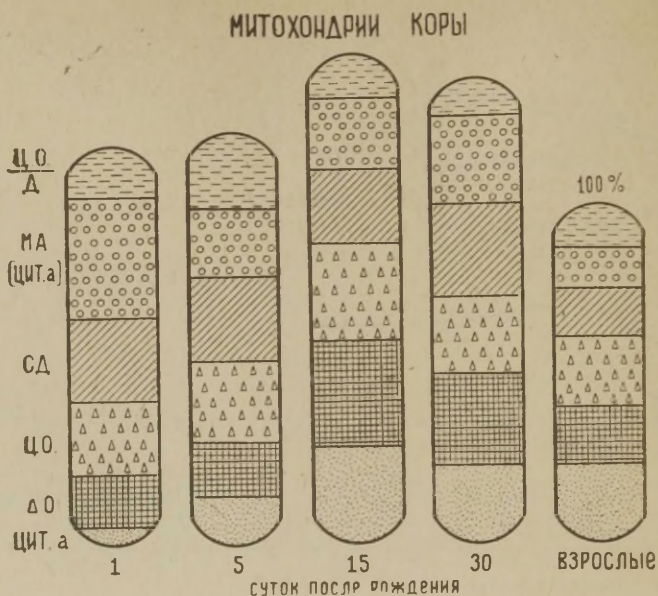


Рис. 7. Некоторые биохимические свойства митохондрий коры мозга кролика на разных этапах постнатального развития.

Обозначения снизу вверх — концентрация цитохрома *a*, интенсивность дыхания ( $\Delta O$ ), активность цитохромоксидазы ( $\frac{C.O.}{\Delta}$ ), активность сукцинатдегидрогеназы ( $CД$ ), молекулярная активность цитохрома *a* при окислении глутаминовой кислоты ( $МА$  (цит. *a*)), соотношение между активностью цитохромоксидазы и интенсивностью дыхания ( $\frac{C.O.}{\Delta}$ ). Все показатели выражены в % от их величин в митохондриях взрослого животного (на мг белка).

гих авторов (17, 18), по мере развития этих животных строение митохондрий мозга (плотность мембран, количество крист и т. д.) изменяется. Несколько менее выраженную, чем у взрослых, дифференцировку структур митохондрий во фракциях из мозга новорожденных кроликов отметили и мы при контролировании фракций под электронным микроскопом.

Согласно результатам морфологических исследований, интенсивное нарастание массы мозга у кролика происходит в первые 40 дней жизни (18). В течение этого периода идет и основная внутриклеточная дифференцировка, в частности, объем нейронов в коре мозга увеличивается, но плотность их расположения уменьшается. В период с 5 по 30-й день идет усиленное образование базальных (5—10-й дни) и апикальных (10—30-й дни) дендритов (20).

Представленные нами данные позволяют предполагать, что на каждом из этапов морфо-функционального развития мозга

## МИТОХОНДРИИ СТОЛА

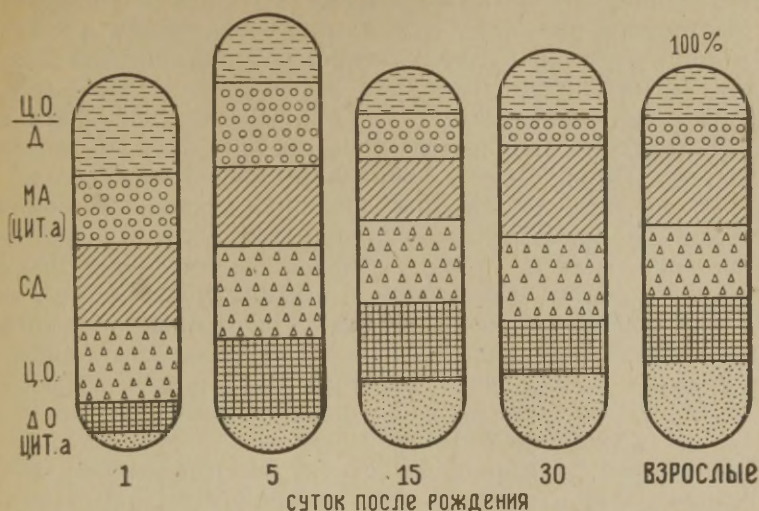


Рис. 8. Некоторые биохимические свойства митохондрий ствола мозга кролика на разных этапах постнатального развития.

Обозначения те же, что и к рис. 7.

митохондрии отличаются по характеру организации ЦПЭ. Это проявляется в величинах концентрации и активности компонентов цепи и в свойствах белково-липидных комплексов мембран. В первые дни после рождения, когда энергетические потребности мозга в связи с интенсивными синтетическими процессами велики, митохондрии характеризуются довольно высоким уровнем окислительной активности и уже к 5-м суткам способны обеспечить такой же выход энергии, как и митохондрии взрослого животного. Это достигается низкой концентрацией цитохромов с высокой биологической активностью и относительно высокой активностью соответствующих ферментных систем. Митохондриальные мембраны в это время, по-видимому, легко доступны для субстратов окисления, о чем свидетельствует способность митохондрий сильно набухать под влиянием детергентов на белки и липиды.

В период массового образования дендритов в коре (10—30-е сутки), когда идут процессы миелинизации и накопления липидов в мозгу и его митохондриях (19, 21, 22), в выделенных фракциях начинают преобладать митохондрии отростков нервных клеток. В это время по интенсивности окислительных процессов, а также по активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга (как 15-, так и 30-дневных кроли-



ков) значительно превалируют над митохондриями взрослых кроликов. Концентрация и биологическая (молекулярная) активность цитохромов приближается по своим величинам к таковым митохондрий взрослого. Существенно, что повышенная метаболическая активность митохондрий коррелирует с уменьшением их способности к набуханию под влиянием дезоксихолата натрия и трипсина, т. е. с изменением свойств белково-липидных компонентов. По-видимому, преимущественное накопление липидов (или /и/ изменение их локализации и связей) в мембранах митохондрий в процессе дифференцировки структур последних является одним из факторов, обеспечивающих лучшее взаимодействие компонентов ЦПЭ между собой и субстратами, а вместе с тем и определенную активность этих компонентов. Завершение формирования дыхательных механизмов мозга происходит на поздних этапах постнатального развития. По нашим данным, до 120-х суток еще не заканчивается накопление цитохромов (4), продолжается и синтез липидов.

По-видимому, формирование структуры и функций ЦПЭ в митохондриях коры и ствола идет по единому плану. Вместе с тем, начиная с 5-х суток митохондрии ствола мозга по большинству показателей несколько отличаются от митохондрий коры. Можно полагать, что эти отличия в значительной мере обусловлены соответственно разной композицией указанных образований мозга по числу и степени дифференцировки нейронов и глиальных клеток, отличиями во времени созревания, а возможно также особенностями метаболических свойств соответствующих митохондрий.

Результаты настоящего исследования дают основание полагать, что окислительная активность ткани разных отделов мозга определяется не только числом митохондрий, но и морфо-химическими свойствами этих органелл. Высказанные нами положения нуждаются в дальнейшей экспериментальной проверке на возможно гомогенных фракциях, лишенных немитохондриальных примесей, включающих преимущественно митохондрии одного типа — нейронов или глии. В этом отношении онтогенетический метод исследования может быть перспективным при сравнительном изучении развития мозга животных различных уровней филогенеза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dahl D., Samson F., Amer. J. Physiol., 196, 470, 1959.
2. Samson F., William J., Balfour M., Jacobs R., Amer. J. Physiol., 199, 693, 1960.
3. Fonyo A., Samogyi J., Acta physiol. Acad. sci. Hungarica, 18, 191, 1960.
4. Пигарева З. Д., Ж. эволюц. биохимии и физиол., 1, 413, 1965.
5. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., J. Biol. Chem., 193, 256, 1951.

6. Cleland K., *Nature*, **170**, 497, 1952.
7. Ennor A., Rosenberg H., *Biochem. J.*, **50**, 529, 1952.
8. Schneider W., Potter V., *J. Biol. Chem.*, **149**, 217, 1943.
9. Löwtrup S., *J. Neurochem.*, **8**, 243, 1961.
10. Wechsler M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 494, 1961.
11. Доведова Е. Л., см. настоящий сб., стр. 193.
12. Пигарева З. Д., Доведова Е. Л., Камышева А. С., Тезисы докладов V Всес. конф. по нейрохимии, Тбилиси, 1968, стр. 55.
13. Бунятыян Г. Х., Симонян А. А., Докл. АН Арм. ССР, **41**, 2, 97, 1965.
14. Sactor B., Racker L., *J. Neurochem.*, **9**, 371, 1962.
15. Пигарева З. Д., Боголепов Н. Н., Гулидова Г. П., Доведова Е. Л., в кн.: Митохондрии, структура и функции. Изд-во Наука, М., 25, 1966.
16. Abdel-Latif A., Abood L., *J. Neurochem.*, **11**, 17, 1964.
17. Petrushka E., Guiditta C., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **6**, 129, 1959.
18. Глезер И. И., *Цитология*, **6**, 305, 1964.
19. Дмитриева Н. И., Калинина Е. Н., *Ж. эволюц. биохимии и физиол.*, **1**, 192, 1965.
20. Shade J., Baxter C., *Exper. Neurol.*, **2**, 158, 1960.
21. Davison A., Wajda M., *J. Neurochem.*, **4**, 453, 1959.
22. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., *Ж. эволюц. биохимии и физиол.*, **1**, 16, 1965.

## ВЛИЯНИЕ ГЛУБОКОЙ ГИПОКСИИ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕРВНОЙ ТКАНИ

Л. М. Герштейн, М. С. Гаевская, Е. А. Носова, Л. М. Слёз

Лаборатория экспериментальной физиологии по оживлению организма АМН СССР и Институт мозга АМН СССР, Москва

Известно, что глубокая гипоксия, наступающая при состоянии клинической смерти, приводит к истощению в ткани мозга субстратов энергетического обмена и некоторым нарушениям в ней азотистого обмена. В процессе оживления в мозге животного постепенно восстанавливается содержание этих субстратов и несколько позднее нормализуется азотистый обмен (1—4). Об изменении активности ферментов энергетического и пластического обмена мозга в этих состояниях имеются лишь единичные сведения. Так, показано (5), что в мозгу крыс во время клинической смерти активность сукцинатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы снижается и в течение 30 минут после оживления еще не происходит восстановления их активности. Больше сведений имеется о влиянии на активность ферментов мозга гипоксической гипоксии. Показано, что наступающие изменения в активности ферментов зависят от глубины и длительности ее воздействия (6—9).

В задачу данной работы входило исследование гистохимическими методами изменений активности аминопептидазы, глутаматдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, а также изменений состояния белковых веществ в разных образованиях двигательного анализатора в период клинической смерти и после оживления.

### Методика

Опыты проведены на взрослых собаках обоего пола, находившихся под неглубоким пантопонно-нембуталовым наркозом. Нембутал (0,2% раствор) вводили внутривенно, капельно в дозе от 7 до 14 мг/кг веса животного. Состояние клинической смерти вызывали быстрым массивным кровопусканием и продолжительность ее (3—5 минут) устанавливали в обратной зависимости от длительности и тяжести умирания. Оживление проводили по методу В. А.



Неговского и сотр. (10). В качестве контроля был взят мозг декапитированных собак. Для исследования брали кору больших полушарий (поле 4), а также другие образования мозга, объединенные в систему двигательного анализатора (зрительный бугор, продолговатый мозг на уровне нежного и клиновидного пучков и межпозвоночный узел). Из свежемороженой нефиксированной ткани мозга в криостате изготавливали срезы толщиной 20 мк. С помощью гистохимических методов выявляли распределение аминопептидазы (11), глутаматдегидрогеназы (12), сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы (13). Активность ферментов оценивали визуально на основании интенсивности цветных реакций. Распределение и содержание белковых веществ изучали с помощью реакции Даниелли, а также реакций на сульфгидрильные (14) и карбоксильные (15) группы. Для морфологического контроля срезы окрашивали по методу Ниссля. Амидные группы суммарных белков коры мозга, замороженной *in situ* жидким азотом, определяли по методу Гершенвича и Кричевской (16).

## Результаты опытов и их обсуждение

У животных, мозг которых был взят во время клинической смерти, локализация и активность \* цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы в коре мозга оказались такими же, как у контрольных животных. Так же как и в норме, глутаматдегидрогеназа выявлялась не только в нервных, но и в глиальных клетках. Кроме того, наблюдалось повышение интенсивности реакции на глутаматдегидрогеназу в цитоплазме тел нейронов от вышележащих к нижележащим слоям, особенно заметное до слоя V.

Цитохромоксидаза была локализована в цитоплазме тел нервных клеток, однако в верхних слоях (I—III) коры интенсивность реакции в телах была такая же, как и в окружающих структурах, поэтому тела нейронов были неразличимы. В нижележащих слоях, особенно в слое V, нейроны выделялись своей интенсивной реакцией. Сходную картину мы наблюдали при выявлении сукцинатдегидрогеназы.

Таким образом, при данной постановке опытов и примененных методиках нам не удалось отметить снижения активности окислительных ферментов под влиянием гипоксии, описанного другими авторами (5, 8, 9).

У собак, находившихся в состоянии клинической смерти, в нейронах всех слоев коры мозга наблюдалось некоторое повышение активности аминопептидазы по сравнению с контролем (рис. 1). С этим может быть поставлено в связь найденное у этих же животных достоверное повышение содержания в коре мозга ряда свободных аминокислот, таких как аланин, метионин, лизин, гистидин (17). В это же время наблюдались изменения в интенсивности реакции на белковые вещества и их активные кон-

\* Под активностью фермента ткани в данном случае и далее понимается потенциальная активность его, проявляющаяся в соответствующих оптимальных условиях (рН, наличие  $O_2$  и т. д.).

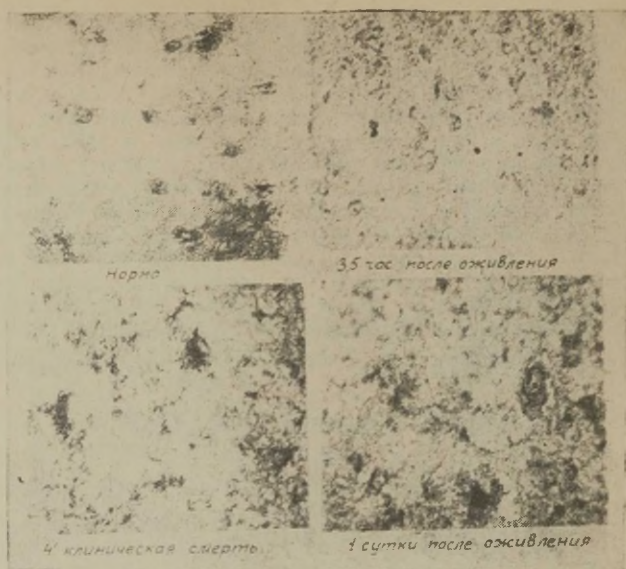


Рис. 1. Распределение аминопептидазы в коре мозга.  
Метод Нахласа в модификации Герштейн.

а — норма; б — клиническая смерть; в — 3,5 часа после оживления; г — 1 сутки после оживления.

цевые группы. Во всех слоях коры появлялось большее или меньшее число нейронов, у которых интенсивность реакции в цитоплазме была значительно повышена (рис. 2). Однако у большинства животных наибольшее повышение интенсивности этой реакции наблюдалось в нижних слоях — V—VII. При этом для мелких нейронов было характерно повышение интенсивности реакции на белковые вещества в перинуклеарной зоне, тогда как в крупных нейронах и особенно в гигантских пирамидах Беца или вся цитоплазма и отростки давали интенсивную цветную реакцию, или в цитоплазме появлялись окрашенные зерна различных размеров. Необходимо отметить, что повышение интенсивности реакции в структурах нейронов не сопровождалось изменением их размеров или другими патологическими изменениями структуры, в чем нас убеждает морфологический контроль при окрашивании препаратов по Нисслю. Биохимические исследования, проведенные на этих животных, показали наличие изменений в распределении амидных групп белков коры мозга: количество легкогидролизуемых амидных групп уменьшалось, а прочносвязанных — возрастало (табл. 1). Сопоставление данных, полученных гистохимическими и биохимическими методами, позволяет предположить наличие конформационных изменений белков коры мозга у собак при состоянии клинической смерти.



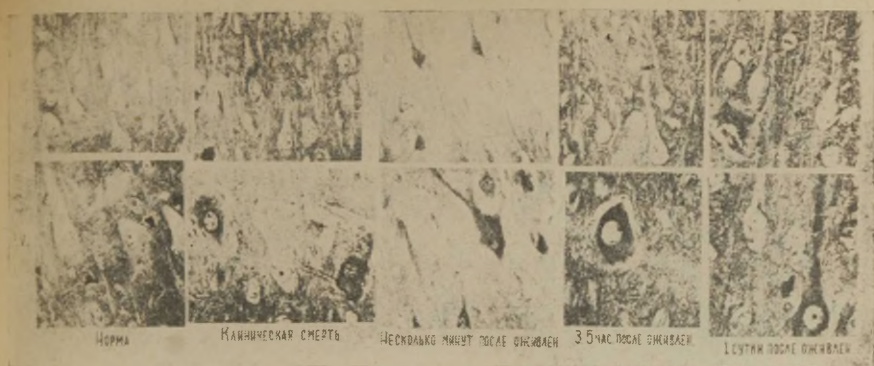


Рис. 2. Распределение белковых веществ в коре мозга. Метод Даниелли.  
а — норма; б — клиническая смерть; в — несколько минут после оживления; г — 3,5 часа после оживления; д — одни сутки после оживления.

У собак, проживших 3,5 часа от начала оживления, в нейронах коры уровень активности глутаматдегидрогеназы, цитохромоксидазы и, в меньшей степени, сукцинатдегидрогеназы повышается по сравнению с уровнем активности этих ферментов у контрольных животных и животных в состоянии клинической смерти (рис. 3 и 4). При этом, если активность глутаматдегид-

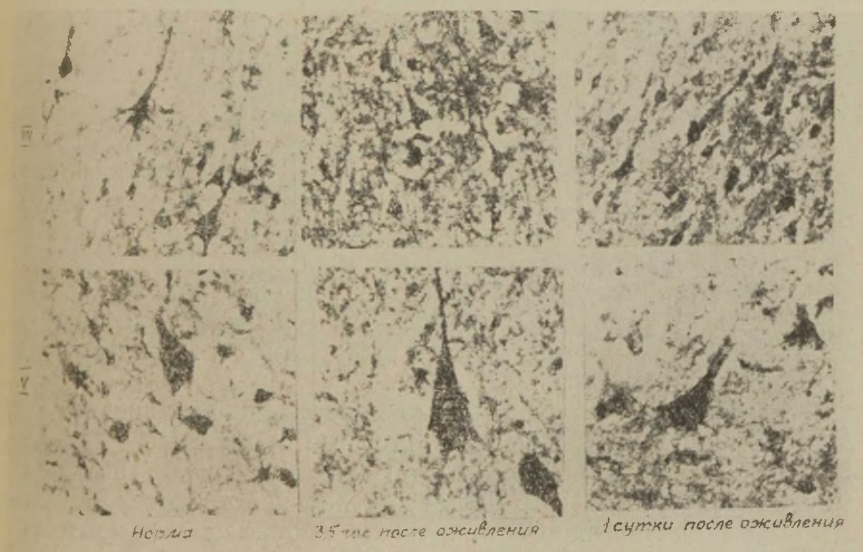


Рис. 3. Распределение глутаматдегидрогеназы в коре мозга. Метод Нахласа в модификации Культас.

а — норма; б — 3,5 часа после оживления; в — 1 сутки после оживления.



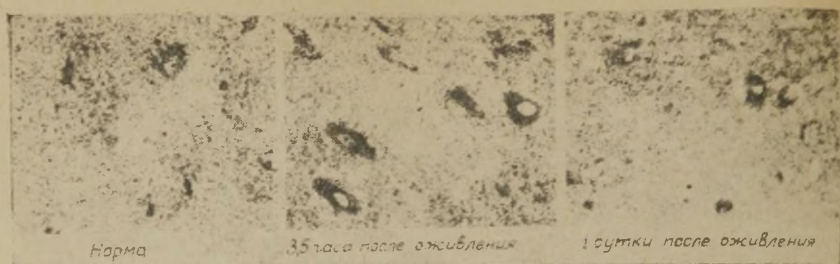


Рис. 4. Распределение цитохромоксидазы в коре мозга. Метод Нахласа.  
а — норма; б — 3,5 часа после оживления; в — 1 сутки после оживления.

рогеназы была повышена во всех слоях коры мозга, то для цитохромоксидазы характерно повышение уровня активности главным образом в нейронах и окружающих их структурах слоев III и V. Нами не была исследована активность окислительных ферментов в коре мозга у животных в начальном периоде оживления, но, судя по данным других авторов (5, 9), активность их в это время должна была быть понижена. Как известно, в начальном периоде оживления ткань мозга находится в состоянии гистотоксической гипоксии (2, 18), из которого она выходит примерно через час после оживления. По-видимому, повышение активности окислительных ферментов в коре мозга через 3,5 часа после оживления являлось компенсаторной реакцией на перенесенную гипоксию.

Через 3,5 часа после оживления в нейронах коры мозга собак активность аминопептидазы оказалась ниже, чем ее активность во время клинической смерти и даже ниже, чем у контрольных животных (рис. 1). Этому соответствовала относительная нормализация в содержании свободных аминокислот в ткани мозга. В этот же период в разных участках коры обнаруживалось большее или меньшее число нервных клеток, дающих интенсивную реакцию при выявлении белковых веществ (рис. 2). Однако по сравнению с клинической смертью интенсивность реакции не увеличивалась, напротив, можно было заметить тенденцию к нормализации процесса.

Через сутки после оживления наблюдалась нормализация тех сдвигов в активности ферментов, которые отмечались на предыдущем этапе. Так, активность глутаматдегидрогеназы снижалась до исходного уровня, в то время как активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы также снижалась, но не достигала степени их активности у контрольных животных (рис. 3 и 4).

Что касается аминопептидазы, то активность ее повышалась по сравнению с таковой у собак через 3,5 часа после оживления

и приближалась к активности ее в коре мозга контрольных животных (рис. 1).

Исследование распределения и содержания белковых веществ через сутки после оживления показало тенденцию к нормализации обнаруженных ранее изменений в коре мозга у собак в соответствии с их физиологическим состоянием. У одной из обследованных собак во всех слоях коры распределение и содержание белковых веществ приближались к норме. Эта собака перенесла состояние клинической смерти в течение 3 минут при длительности предшествующего умирания 15 минут. Восстановление жизненных функций у нее проходило быстро и через сутки после оживления собака видела, слышала, адекватно реагировала на внешние раздражители, ходила, охотно принимала пищу. Состояние второй собаки через сутки после оживления внешне было таким же, как и у первой, но она перенесла гораздо более длительный период умирания — около 35 минут. По-видимому, в связи с этим во всех слоях коры мозга имелось большое число нейронов, в которых была повышена интенсивность реакции на белковые вещества не только в цитоплазме, но и в ядре. У третьей из обследованных собак через сутки после оживления наблюдалось неполное восстановление функций центральной нервной системы: она не вставала, при попытке поставить ее на лапы — падала, хотя слух, зрение и адекватная реакция на окружающее у нее уже восстановились. У этой собаки распределение и содержание белковых веществ в верхних слоях коры было таким же, как у контрольных животных, в то время как в нижних слоях еще встречались нейроны, цитоплазма тел которых давала более интенсивную реакцию на белки и их функциональные группы (рис. 2).

Соответственно неполной нормализации в распределении и концентрации белковых веществ, определяемых гистохимически, соотношение амидных групп белков в коре мозга этих собак продолжало оставаться измененным (табл. 1).

У собак, обследованных через двое суток после оживления, наблюдалось внешне полное восстановление функций ЦНС. Уровень активности всех исследованных ферментов, а также распределение и содержание белковых веществ и их функциональных групп в структурах коры мозга были такими же, как у контрольных животных. У этих же собак отношение прочносвязанных амидных групп белков к легкогидролизуемым (табл. 1) составляло 1,44, т. е. приближалось к исходному. Следует заметить, что у тех животных, у которых через двое суток после оживления восстановление функций ЦНС было неполным, соотношение амидных групп белков оказалось очень высоким (гистохимические исследования у этих животных не были проведены).

Таким образом, приведенный фактический материал показал соответствие между процессами обмена веществ на клеточном

Таблица 1

Изменение содержания амидных групп суммарных белков в коре мозга собак при умирании и оживлении

Состояние животных		Условные обозначения	Амидные группы в мкг N-NH <sub>2</sub> на мг сух. белка		А/В
			Прочно-связ. А	Легкогидр. В	
Пантопонно-небуталовый наркоз		$M \pm m$ п	$3,51 \pm 0,05$ 5	$3,00 \pm 0,06$ 5	1,17
5-минутная клиническая смерть		$M \pm m$ п Р <sub>исх.</sub>	$4,72 \pm 0,07$ 5 < 0,01	$2,30 \pm 0,24$ 5 < 0,05	2,05
Через 24 часа после оживления		$M \pm m$ п Р <sub>исх.</sub>	$4,58 \pm 0,27$ 5 < 0,01	$2,38 \pm 0,15$ 5 < 0,01	1,92
Через 48 час. после оживления	Внешне полное восстановление функций ЦНС	$M \pm m$ п Р <sub>исх.</sub>	$4,13 \pm 0,11$ 3 < 0,01	$2,87 \pm 0,26$ 3 > 0,1	1,44
	Неполное восстановление функций ЦНС	$M \pm m$ п Р <sub>исх.</sub>	$5,02 \pm 0,31$ 3 < 0,01	$1,80 \pm 0,34$ 3 < 0,02	2,79

уровне, определяемом биохимическими методами, с физиологическим состоянием животных в восстановительном периоде после перенесенной гипоксии.

Приведенные выше гистохимические данные относились к корковому отделу системы двигательного анализатора. В других образованиях мозга, входящих в состав двигательного анализатора, наблюдался в основном тот же характер изменений, какой отмечен для коркового отдела его. Так, уровень активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы через 3,5 часа после оживления был выше, чем в исходном состоянии и во время клинической смерти во всех образованиях двигательного анализатора. Подобные изменения отмечены для глутаматдегидрогеназы за исключением того, что через 3,5 часа после оживления активность ее в зрительном бугре не повышалась, как в других образованиях, а несколько снижалась. К исходному уровню активности всех этих ферментов возвращалась к концу вторых суток после оживления.



Иная картина наблюдалась в отношении активности аминоксипептидазы. Если активность ее в коре мозга во время клинической смерти была повышена, то в межпозвоночных узлах и в мотонейронах спинного мозга она была ниже, чем у контрольных животных. Соответственно этому, к 3,5 часам после оживления активность аминоксипептидазы в коре мозга уже значительно снижалась, а в мотонейронах спинного мозга и межпозвоночных узлах она возрастала и становилась выше исходного уровня. Через двое суток после оживления активность аминоксипептидазы во всех образованиях двигательного анализатора приближалась к исходной.

Как было показано предыдущими исследованиями, во время агонии и клинической смерти в ткани мозга преобладают процессы гликолиза, сопровождающиеся снижением энергетических ресурсов. Происходящее на этом фоне в коре мозга повышение активности аминоксипептидазы могло способствовать изменению состояния тканевых белков. В этом отношении кора мозга оказывалась в худшем положении по сравнению с нижележащими отделами центральной нервной системы, в которых активность аминоксипептидазы в это время снижалась. Возможно, это является одной из причин, от которых зависит особая чувствительность коры больших полушарий мозга к гипоксии.

## Выводы

1. Во всех образованиях мозга, входящих в состав двигательного анализатора, потенциальная активность окислительных ферментов (сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы) и глутаматдегидрогеназы сохранялась в процессе умирания от острой смертельной кровопотери и в течение 5 минут клинической смерти.

2. Сопоставление данных об изменении активности аминоксипептидазы, о распределении состояния белковых веществ в корковом отделе двигательного анализатора, а также о соотношении амидных групп суммарных белков в коре мозга позволяет предположить, что трансконформационные изменения в белках мозга начинаются уже во время клинической смерти.

3. В первые сутки восстановительного периода после перенесенной клинической смерти наблюдалось компенсаторное повышение активности глутаматдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы как в корковом отделе, так и в большинстве других образований мозга, входящих в состав двигательного анализатора.

4. Через двое суток после оживления у собак, состояние которых внешне не отличалось от доопытного, уровень активности

исследованных ферментов, а также распределение и содержание белковых веществ и их функциональных групп в структурах двигательного анализатора мозга возвращались к исходному состоянию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гаевская М. С., Биохимия мозга при умирании и оживлении организма. Медгиз, 1963.
2. Носова Е. А., Вопросы мед. химии, **6**, 264—270, 1960.
3. Гаевская М. С., Носова Е. А., Труды III Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы. Изд. АН Арм. ССР, Ереван, 421—430, 1963.
4. Гаевская М. С., Носова Е. А., Слѣз Л. М., Укр. биох. журнал, № 5, 691—695, 1965.
5. Дьякова А. М., Силантьева З. М., Протодяконова Т. Н., Укр. биохим. журнал, № 1, 95—98, 1966.
6. Палладин А. В., Хайкина Б. И., Полякова Н. М., Гончарова Е. Е., Михайловская А. А., В кн.: Кислородная терапия, Киев, 7—13, 1952.
7. Гольденберг А. М., Труды конф. молодых ученых, Иваново-Франковск, 70—74, 1964.
8. MacDonald M., Spector R. G., Brit. J. exptl. pathol., **44**, 1, 11—15, 1963.
9. Spector R. G., Brit. J. exptl. pathol., **44**, 3, 251—254, 1963.
10. Неговский В. А., Патофизиология и терапия агонии и клинической смерти, Медгиз, 1954.
11. Герштейн Л. М., Цитология, **7**, 769—773, 1965.
12. Kultas H. K. N., Folia morphologica, **13**, 1, 43—50, 1965.
13. Пирс Э., Гистохимия, ИЛ, Москва, 834 и 844, 1962.
14. Barrnett R., Seligman A., Science, **116**, 323—327, 1952.
15. Герштейн Л. М., Цветкова И. В., Цитология, **2**, 201—207, 1960.
16. Гершеневич З. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина Н. А., Труды III Всес. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 91—101, 1963.
17. Гаевская М. С., Португалов В. В., Носова Е. А., Герштейн Л. М., Сб.: Проблемы нейрохимии, Ленинград, изд-во Наукз, 88—96, 1966.
18. Смиренская Е. М., Архив патологии, **8**, 1—2, 12—21, 1946.

## О РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Г. А. Нечаева

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В настоящее время уже известно много фактов, свидетельствующих об изменениях метаболизма белков и нуклеиновых кислот (1—4) в различных отделах нервной системы при сдвигах ее функционального состояния. Одним из подходов к изучению механизма этих изменений может быть исследование рибонуклеаз (РНКаз) ткани мозга, так как РНКазы принимают участие в процессах распада, а по некоторым данным, и в процессах синтеза РНК, следовательно — и рибонуклеопротеидов, а в конечном счете — и белков. Исследование РНКазной активности ткани мозга проводили Сквирская и Силич (5), Лльямас и Коронас (6) и другие (7, 8). Однако полученные результаты порой противоречивы и совершенно отсутствуют данные о какой-либо взаимосвязи между активностью РНКаз мозга и его функциональным состоянием.

Нами ранее (9—11) и в последующих опытах были исследованы активность и некоторые свойства РНКаз головного мозга, ингибитор РНКазы, распределение РНКаз в различных субцеллюлярных фракциях, изменение активности РНКаз под влиянием агентов, вызывающих сдвиги функционального состояния нервной ткани — ацетилхолина, адреналина и кардиазола.

### Методика

Адреналин вводили подкожно кошкам по 60 мкг и крысам по 30 мкг на животное ежедневно в течение двух недель. Кардиазол вводили крысам по 80 мг на кг веса и животных обезглавливали во время судорог.

Все операции производили в холодной комнате при температуре 0—2°C. После декапитации извлекали головной мозг, отделяли по возможности кору больших полушарий и кусочки ткани гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Из полученного гомогената методом дифференциального центрифугирования (10) получали ядерную, митохондриальную, микросомальную и надосадочную фракции. Митохондриальную фракцию делили на субфракции белых и окрашенных (относительно чистые митохондрии)



частиц (10). Микросомальную фракцию выделяли центрифугированием в течение 2 часов при 40 000 об/мин надосадочной жидкости, полученной после осаждения митохондриальной фракции.

При подсчете % распределения содержания РНК-аз во фракциях, ядерную, митохондриальную и микросомальную фракции получали из одного гомогената приготовленного с 0,32 М раствором сахарозы с 1 мМ ЭДТА, 1 мМ  $\text{KHCO}_3$ , рН раствора доводили 0,1 N NaOH до 7,4.

Активность РНКаз определяли, как описано ранее (9, 10), с той разницей, что в качестве осадителя РНК и белков использовали  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в 76% этаноле с 1 N HCl. Белки определяли методом Лоури (12) и микробиуретовым методом (13).

## Результаты исследований

РНКазы животных и растительных тканей по оптимальной активности делят на кислые и щелочные. Отношение активности щелочной РНКазы к кислой варьирует в разных органах от 6 до 2 (14).

В гомогенатах мозга, по нашим данным (9, 10), РНКазная активность выражена преимущественно в кислой зоне, в щелочной зоне активность незначительна. С помощью фракционирования сульфатом аммония методом Шапота и др. (15) из гомогенатов мозга нами были выделены и очищены примерно в 40 раз препараты кислой и щелочной РНКаз.

На рис. 1 представлены результаты определения активности частично очищенных препаратов кислой и щелочной РНКаз при различных значениях рН. При инкубации 30 мкг белка ферментных препаратов в случае кислой РНКазы прирост оптической плотности ( $\Delta E_{260}$ ) за 30 мин. составлял 1,6; а в случае щелоч-

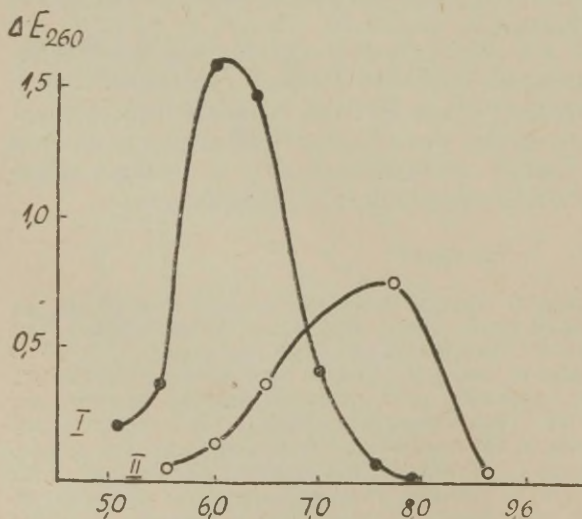


Рис. 1. Активность препаратов кислой (I) и щелочной (II) рибонуклеаз, выделенных из гомогенатов головного мозга, при различных значениях рН.

На оси абсцисс — величина рН; на оси ординат —  $E_{260}/30$  мкг белка. Каждая точка на кривых, на этом и последующих рисунках, является средним из 5—10 определений. Инкубацию проводили в ацетатно-вероналовом буфере (конечная концентрация буфера 0,05 М. РНК — 0,3%) 30 мин. при 37° С.

ной — 0,78. Можно видеть, что оптимум активности кислой РНК-азы мозга соответствует рН 6,0, а щелочной — 7,8.

На рис. 2 представлено распределение кислой и щелочной РНКаз в различных субцеллюлярных фракциях ткани коры больших полушарий головного мозга крыс. Во всех субфракциях, как и в гомогенате ткани мозга, активность кислой РНКазы выше, чем щелочной. Этим ткань мозга отличается от печени, в гомогенатах, ядерной, микросомальной и растворимой клеточных фракциях которой преобладает активность щелочной РНКазы (14, 16).

$\Delta E_{260}/1 \text{ мг белка}$

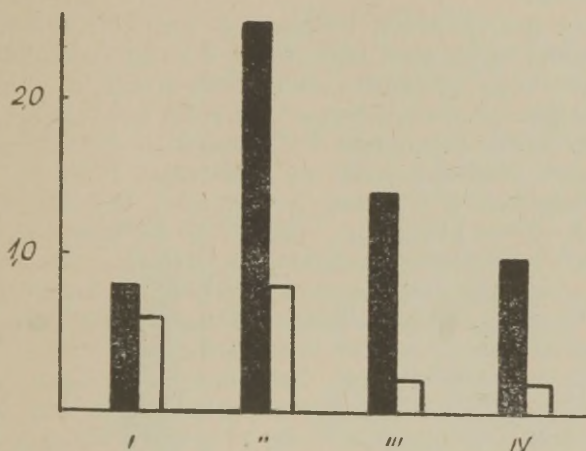


Рис. 2. Активность кислой (рН 6,0 — заштрихованные столбики) и щелочной (рН 7,8 — белые столбики) РНКаз ядерной (I), митохондриальной (II), микросомальной (III) и растворимой клеточной фракций (IV).

По оси ординат здесь и на последующих рисунках —  $E_{260}/1 \text{ мг белка}$ .

В микросомальной фракции активность кислой РНКазы по нашим определениям в 5 раз больше, чем щелочной. Это совпадает с результатами опытов Датта и др. (17), которые подробно исследовали РНКазную активность рибосом мозга. По данным же Льямаса и Коронаса (6), в микросомальной фракции ткани мозга активность щелочной РНКазы выше, чем кислой. Возможно это объясняется тем, что активность кислой РНКазы эти авторы определяли при рН 5,5, а не при рН 6,0, как в наших опытах.

При расчете на мг белка наибольшая активность кислой РНКазы обнаруживается в митохондриальной фракции, на втором месте стоит микросомальная фракция. Отношение активности кислой РНКазы в митохондриальной фракции к активности в ядрах и микросомальной фракции выше, чем по данным Льямаса и Коронаса (6) и Маса (7). По-видимому, это связано с тем, что в наших опытах была исследована обогащенная митохондриями субфракция окрашенных частиц митохондриальной фракции, а не суммарная митохондриальная фракция, как в опытах этих авторов.

Если принять величину суммарной активности кислой РНКазы всех фракций за 100%, то в митохондриальной фракции обнаруживается 54%, в ядерной и микросомальной — по 15% и в растворимой клеточной фракции — 16% общей активности кислой РНКазы.

Активность щелочной РНКазы в ядерной и митохондриальной фракциях примерно одинакова, в микросомальной и растворимой клеточной фракциях она незначительна.

Без специальной обработки тканевых препаратов можно выявить лишь часть щелочной РНКазы. Это связано с тем, что в клетках есть особый ингибитор щелочных РНКаз, который был впервые обнаружен в ткани печени (16, 18). По данным Рота (18) и Шортмэна (19), это — вещество белковой природы, которое тормозит активность щелочной РНКазы, образуя с ней неактивные комплексы при помощи SH-групп. Поэтому ингибитор может быть полностью инактивирован сульфгидрильными ядами, например пара-хлормеркурибензоатом (ПХМБ).

В ткани мозга ингибитор был обнаружен Хуком (8) и Льямасом и Коронасом (6) в растворимой клеточной фракции. Содержание ингибитора в этой фракции настолько велико, что растворимая фракция мозга, как и других органов (18, 19), может тормозить значительные количества добавленной извне панкреатической щелочной РНКазы (см. рис. 3). При инкубации с растворимой клеточной фракцией из мозга активность панкреатической РНКазы (кривая 1) в условиях наших опытов уменьшалась вдвое (кривая 2). Добавление ПХМБ полностью снимало тормозящее влияние растворимой клеточной фракции мозга на эту РНКазу (кривая 3).

Сравнительное определение активности кислой и щелочной РНКаз в ткани мозга и печени (рис. 4) без предварительной обработки гомогенатов ПХМБ и после нее, когда вся щелочная РНКаз была переведена в активное состояние, подтвердило наши прежние данные о том, что для ткани мозга характерно преобладание активности кислой РНКазы, а в ткани печени более активна щелочная РНКаз.

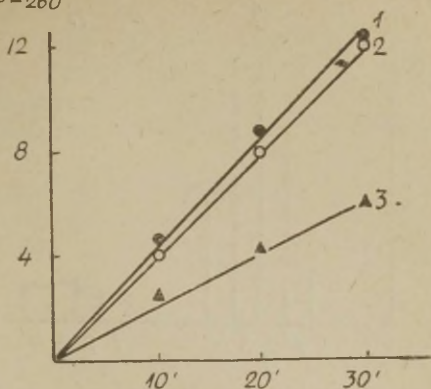
С помощью фракционирования сульфатом аммония ингибитор растворимой клеточной фракции был очищен нами примерно



Рис. 3. Активность 0,01 мкг кристаллической панкреатической рибонуклеазы во времени (2), с добавлением 0,2 мл (1:50) растворимой клеточной фракции ткани головного мозга (3); с добавлением растворимой клеточной фракции и  $2 \cdot 10^{-3}$  М ПХМБ (1). Конечный объем 1 мл; концентрация трис-буфера 0,03 М; РНК — 0,3%; рН 7,8.

По оси абсцисс — время в мин.

$\Delta E_{260}$



А Б

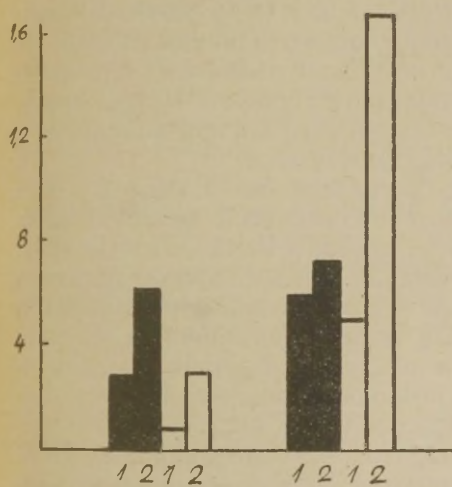


Рис. 4. Активность кислой (рН 6,0 — заштрихованные столбики) и щелочной рибонуклеаз (рН 7,8 — белые столбики) в гомогенатах мозга (А) и печени (Б) при определении с добавлением  $2 \cdot 10^{-3}$  М ПХМБ (2) и без него (1).

в 35 раз. Частично очищенный ингибитор тормозил активность щелочной РНКазы гомогената и митохондриальной фракции, но не действовал на кислую РНКазу митохондрий. Ингибитор из ткани мозга инактивируется при нагревании. По всем этим свойствам он напоминает ингибитор из ткани печени (18, 19).

Кислая РНКазы мозга является неполностью активной, но ее торможение связано с другими причинами. Так, большая часть кислой РНКазы митохондрий проявляет активность только после ряда воздействий: последовательных чередований замораживания и оттаивания, воздействия ПХМБ и концентрированных растворов мочевины. Шестикратное замораживание и оттаивание (рис. 5) повышает активность кислой РНКазы митохондрий в 3—4 раза, обработка 4 М мочевиной — в 5 раз, ПХМБ — в 3

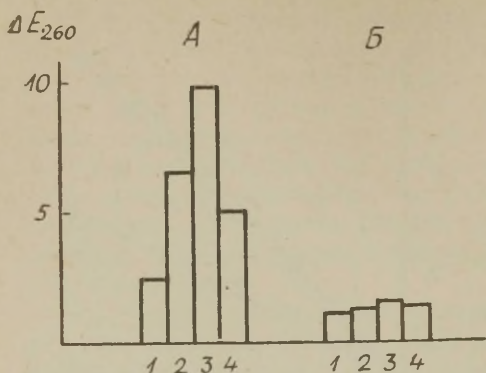


Рис. 5. Влияние замораживания и оттаивания (2), предварительного воздействия 4 М мочевины (3) и  $2 \cdot 10^{-3}$  М ПХМБ (4) на активность кислой (А) и щелочной (Б) рибонуклеаз окрашенной субфракции митохондриальной фракции.

1 — исходная активность.

раза. На активность щелочной РНКазы все эти воздействия почти не влияют. Отсутствие активирующего влияния ПХМБ на щелочную РНКазу митохондрий позволяет заключить, что ингибитор в митохондриальной фракции отсутствует. По-видимому, часть латентной РНКазы митохондрий связана при помощи SH-групп не с ингибитором, а с белками мембран.

Дополнительные сведения о характере связи кислой и щелочной РНКаз с частицами митохондриальной фракции были получены при очистке этих РНКаз методом Рида и Ноудза (20). Кислая РНКаз полностью переходила в надосадочную жидкость после разрушения митохондрий с помощью замораживания и оттаивания, а щелочная РНКаз оставалась прочно связанной со структурными компонентами осадка и экстрагировалась из него 0,25 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Этот метод позволяет очистить РНКазы митохондриальной фракции примерно в 20 раз. Определение активности частично очищенных препаратов митохондриальных РНКаз показало, что оптимум активности РНКаз соответствует величинам, установленным для суммарной РНКазы гомогенатов: кислой — рН 6,0; а щелочной — 7,8.

Действие 4 М мочевины на латентную кислую РНКазу митохондриальной фракции, вероятно, аналогично действию ее на латентную РНКазу рибосом. В микросомальной фракции 4 М мочевина повышает активность кислой РНКазы в 2 раза. Исследованиями Таширо (21), Элсона (22), Спара и Холингворса (23) показано, что концентрированные растворы мочевины, действуя на водородные связи, освобождают активные центры РНКазы и переводят латентную РНКазу рибосом в активное состояние. Это влияние мочевины необратимо и сохраняется при удалении мочевины, например, с помощью диализа (17). Возможно, что и в митохондриальной фракции имеется РНКаз, связанная с рибонуклеопротеидными частицами. Однако действие мочевины на активность РНКаз более сложное. Так, 4 М мочевина может

влиять и на вторичную структуру РНК. Работами Кальнитского и др. (24) показано, что 4 М мочевины разрывает водородные связи в молекулах нативной РНК, переводя ее в денатурированное состояние. При этом скорость расщепления РНК РНКазой увеличивается. Это действие мочевины полностью обратимо. Усиление эффекта РНКазы в подобном случае достигает, по нашим данным, 50%.

Возможно, что такие механизмы действия РНКаз: их переход из латентного состояния в активное, а также изменения вторичной структуры РНК, могут иметь место также в живых тканях.

В литературе имеются данные о влиянии кардиазола (27) и адреналина (25) на содержание нуклеиновых кислот в нервной ткани. В связи с этим нами были проведены опыты, в которых мы исследовали влияние парэнтерального введения этих веществ на РНКазную активность ткани мозга.

Как видно из табл. 1, ежедневное введение адреналина (А) по 60 мкг кошкам и по 30 мкг крысам в течение 2 недель вызвало повышение активности свободной и содержания латентной кислот РНКазы в митохондриях. У кошек введение адреналина вызывало увеличение активности свободной кислот РНКазы на 160% и суммарной — на 70% (последнее соответствует повышению содержания латентной формы на 50%) по сравнению с контрольными животными. У крыс введение А вызывало меньшее, хотя статистически достоверное повышение активности свободной РНКазы митохондрий на 26% и содержания латентной — на 15%. После введения А увеличивалось содержание также

Таблица 1

Влияние введения адреналина на активность кислых рибонуклеаз ( $\Delta E_{260}/\text{мг}$  белка) гомогената и митохондриальной фракции мозга кошек ( $n = 5$ ) и крыс ( $n = 10$ )

	Гомогенат		Митохондриальная фракция		
	Свободная	Суммарная *	Свободная	Суммарная *	Латентная
Кошки	$1,34 \pm 0,23$	$2,61 \pm 0,51$	$1,56 \pm 0,16$	$7,80 \pm 0,60$	6,24
	$1,55 \pm 0,10$	$4,63 \pm 1,61$	$4,02 \pm 1,12$ + 160% $p < 0,05$	$13,34 \pm 1,74$ + 70% $p < 0,05$	9,32 + 50%
Крысы	$1,40 \pm 0,05$	$2,77 \pm 0,09$	$2,10 \pm 0,05$	$6,82 \pm 0,03$	4,72
	$1,40 \pm 0,17$	$3,14 \pm 0,19$	$2,65 \pm 0,05$ + 26% $p < 0,05$	$7,93 \pm 0,03$ + 17% $p < 0,05$	5,28 + 12%

\* После активирования мочевиной.



латентной щелочной РНКазы в растворимой клеточной фракции, что свидетельствует об увеличении содержания ингибитора.

Каков механизм действия длительного введения А на активность РНКаз и как это связано с его действием на содержание РНК, ответить пока нельзя. Введение А животным может оказывать возбуждающее влияние на адренэргические структуры, что, в свою очередь, должно влиять на функциональное состояние головного мозга. Длительное введение адреналина сопровождается накоплением РНК в нервной ткани (25). В наших опытах после длительного введения А повышалось содержание свободной и латентной фракций кислой РНКазы митохондрий.

После введения А увеличивалось содержание и латентной щелочной РНКазы в растворимой клеточной фракции, что свидетельствует об увеличении содержания ингибитора. Имеются данные, что повышение содержания ингибитора сопровождается повышением синтеза РНК.

Следует отметить, что в другой серии наших опытов (26) было установлено, что ацетилхолин (АХ) *in vitro* вызывает торможение кислой РНКазы митохондрий.

Тальвар и др. (27) установили, что после введения кардиазола во время судорожной фазы содержание РНК в ткани головного мозга уменьшается, в первую очередь в ядерной фракции.

В наших опытах у животных, обезглавленных во время судорог (табл. 2), вызванных введением кардиазола, имело место повышение активности свободной кислой РНКазы митохондриальной фракции на 35%, при одновременном уменьшении содержания латентной РНКазы.

Таблица 2

Влияние кардиазоловых судорог на активность кислой (рН 6,0) и щелочной (рН 7,8) рибонуклеаз ( $\Delta E_{260}/\text{мг}$  белка) митохондриальной фракции ткани коры головного мозга крыс ( $n = 8$ )

рН	Контроль			Кардиазол		
	Свободная	Суммарная *	Латентная	Свободная	Суммарная *	Латентная
6,0	2,77 $\pm 0,023$	8,46 $\pm 0,17$	5,60 $\pm 0,12$	3,75 $\pm 0,18$ -35,4% $P < 0,05$	7,15 $\pm 0,24\%$ -16,5% $P < 0,05$	3,39 $\pm 0,28$ -29,5% $P < 0,05$
7,8	1,69 $\pm 0,07$	3,10 $\pm 0,09$	1,41 $\pm 0,15$	1,59 $\pm 0,06$ -6%	2,81 $\pm 0,06$ -8%	1,21 $\pm 0,08$ -14%

\* После замораживания и оттаивания.

В ядерной фракции, в отличие от митохондриальной, происходило снижение активности свободной кислой РНКазы примерно на 26%. Статистически достоверных сдвигов в активности щелочной РНКазы митохондриальной и ядерной фракций обнаружено не было.

При сопоставлении наших данных с результатами определений содержания РНК в нервной ткани после введения А и кардиазола, проведенных другими авторами (25, 27), наблюдается положительная корреляция между содержанием РНК и активностью латентных кислых РНКаз в митохондриальной фракции. Положительная корреляция между содержанием РНК и активностью кислых РНКаз была отмечена в различных тканях целым рядом авторов (28, 29, 30). Полагают, что в тканях РНКазы, помимо расщепления РНК, могут принимать участие и в процессах ее синтеза путем реакции трансфосфорилирования.

В ткани мозга РНКазы находятся частично в неактивном состоянии и их ингибиторы проявляют определенную специфичность. Так, РНКазу растворимой клеточной фракции тормозит ингибитор, который активен только по отношению к щелочным РНКазам. Латентные кислые РНКазы митохондриальной, а также микросомальной и ядерной фракций, по-видимому, связаны с белками мембран и рибонуклеопротеидными частицами. Исследование природы всех этих белков и свойств их комплексов с РНКазами представит несомненный интерес.

Соотношение активной и латентной форм РНКаз остается при соблюдении стандартных условий исследования всегда постоянным. Это относится как к кислым, так и щелочным РНКазам. В то же время под влиянием тех или иных факторов соотношение между этими формами может быстро меняться со всеми связанными с этими последствиями для метаболизма клеток. Это обстоятельство заслуживает исключительно большого внимания. Особенно лабильны РНКазы митохондриальной фракции.

В митохондриальной фракции, где содержание РНК незначительно (31), обнаруживается очень высокая активность РНКаз, особенно кислой. РНКазная активность митохондриальной фракции, при расчете на мг белка, в несколько раз выше, чем ядерной, микросомальной и растворимой клеточной фракции, и составляет более 50% суммарной РНКазной активности ткани мозга.

При электронно-микроскопическом анализе\* выделенных нами препаратов (окрашенная субфракция митохондриальной фракции) лизосомы в них обнаружены не были, а примесь микросомальных частиц была незначительна (10). Далее, при фракционировании суммарной митохондриальной фракции в суб-

---

\* За проведение электронно-микроскопического анализа приносим благодарность ст. научн. сотр. Института цитологии АН СССР В. Ф. Машанскому.

фракциях с повышенным содержанием митохондрий была обнаружена более высокая РНКазная активность. Изложенное позволяет думать, что в митохондриальной фракции РНКазы, в основном, связаны с митохондриями.

Результаты наших опытов показали, что активность свободной и содержание латентной фракций кислой РНКазы в митохондриях может меняться при сдвигах функционального состояния ткани мозга. Значение этих изменений для метаболизма мозга требует дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., Укр. біохім. журн. 34, 621, 1962. В сб. III Всесоюзн. конферен. по биохимии нервной системы, Ереван, стр. 9, 1963.
2. Владимиров Г. Е., Функциональная биохимия мозга. М., 1953, в. 1, стр. 102. В кн.: Актуальные вопросы современной биохимии 1, Биохимия белков. М., стр. 114, 1959.
3. Крепс Е. М., Журнал высшей нервной деятельности, 7, 75, 1957.
4. Певзнер Л. З., В сб. III Всесоюзн. конф. по биохимии нервной системы, Ереван, стр. 327, 1963.
5. Сквирская Э. Б., Силич Т. П., Сб. Биохимия нервной системы, К., стр. 36, 1954.
6. Llamas R., Coronas E., Ann. Inst. Biol. Univ. Mexico., 31, 3, 1960, 31, 13, 1960.
7. Mase K., J. Japanese Biochem. Soc., 34, 21, 1962.
8. Houck J. C., J. Appl. Physiol., 13, 273, 1958.
9. Нечаева Г. А., Укр. біохім. ж., 36, 607, 1964.
10. Нечаева Г. А., Биохимия, 30, 3, 1965.
11. Демин Н. Н., Нечаева Г. А., ДАН СССР, 166, 6, 1458, 1966.
12. Lowry O. H., Roseborough J. N. et al., J. Biol. Chem., 193, 265, 1957.
13. Itzhaki R. F., Gill D. M., Anal. Biochemistry, 9, 401, 1964.
14. De Lamirande, Allard C. Ann. N.-Y. Ac. Sci., 81, 570, 1959.
15. Шапот В. С., Чудинова И. А., Кречетова Г. Д., В кн.: Современные методы в биохимии, т. 1, М., стр. 267, 1964.
16. Roth J. S., J. Biol. Chem., 208, 181, 1954.
17. Datta R. K., Bhattacharyya D., Chosh J. J., J. Neurochem. 11, 87, 1964.
18. Roth J. S., Biochim. et biophys. acta, 21, 34, 1956.
19. Shortman K., Biochim et biophys. acta, 51, 37, 1961.
20. Reid E., Nides J. T., Ann. N.-Y. Ac. Sci., 81, 542, 1959.
21. Tachiro Y., J. Biochem. (Tokyo), 45, 937, 1958.
22. Elson D., Biochim. et biophys. acta, 36, 372, 1959.
23. Spahr P. F., Hollingworth B. R., J. Biol. Chem., 236, 823, 1961.
24. Kalnitsky G., Hummel J. P., Resnick H., Carter J. R., Ann. N.-Y. Ac. Sci., 81, 542, 1959.
25. Певзнер Л. З., ДАН СССР, 156, 15, 1213, 1964.
26. Демин Н. Н., Наср. сб.
27. Chitre I. S., Chopra S. P., Talwar G. P., J. Neurochem., 7, 439, 1964.
28. Brody S., Biochim. et biophys. acta, 24, 502, 1957.
29. Ledoux L., Pileri A., Vanderhaege F., Brändey, Nature, 180, 1048, 1957.
30. Kessler B., Engelberg N., Biochim. biophys. acta, 55, 70, 1962.
31. Borkowski T., Harth S., Mandel R., Mandel P., Nature, 192, 4801, 456, 1961.



## НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МОЗГА И МОЗГОВЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Л. И. Левченко

Институт нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко АМН СССР, Москва

Нуклеотидный состав нуклеиновых кислот мозга животных исследован довольно подробно работами Броун и сотр., Сквирской и Силич, Rich, Hyden и др. Подобных работ, выполненных на мозге человека, мы не нашли.

Основные трудности, которые возникают при попытках изучения нуклеиновых кислот мозга человека, связаны с получением материала. Ткань, полученная от умерших вследствие различных причин, не связанных с поражением мозга, обычно претерпевает посмертные изменения; у больных, имеющих какие-либо повреждения или заболевания самого мозга, возможно наличие биохимических изменений его ткани.

В условиях нейрохирургической клиники имелась возможность избежать первой сложности, так как мы получали материал немедленно после удаления во время операции и сразу же помещали его на лед. С другой стороны не исключено, что мозговая ткань, которая к нам попадала, имела какие-то изменения, хотя мы старались брать участки, наиболее удаленные от опухоли. Материал, который мы получали при операциях в пределах здоровых тканей, чаще всего был белым веществом мозга. Исследование нуклеотидного состава белого вещества имело для нас важное значение, поскольку из-за богатства глиальных элементов оно в какой-то мере могло служить контролем к глиальным опухолям мозга.

Мы исследовали нуклеотидный состав тотальной РНК и ДНК при помощи хроматографии на бумаге.

В таблице 1 приведены данные о нуклеотидном составе РНК белого вещества мозга человека. Преобладающее место в нем занимает гуанин, затем цитозин, аденин и урацил ( $G > C > A > U$ ), отношение азотистых оснований, содержащих в шестом положении аминогруппу, к основаниям, содержащим в том же положении кетогруппу, равно 0,99, а коэффициент специфичности равен 1,72.

Таблица 1

Нуклеотидный состав РНК белого вещества мозга человека. (Здесь и во всех последующих таблицах Г = гуанин; А = аденин; Ц = цитозин и Т = тимин)

Г	У	Ц	А	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{Г + Ц}{А + У}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
37,6	14,7	28,2	19,5	1,13	1,92	1,33
35,1	15,2	29,8	19,9	0,99	1,85	1,22
34,2	19,6	23,8	22,4	0,86	1,39	1,31
35,6	16,5	27,3	20,6	0,99	1,72	1,28

Таблица 2

Нуклеотидный состав ДНК белого вещества мозга человека

Г	Т	Ц	А	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{Г + Ц}{А + Т}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
31,2	28,0	12,8	28,0	0,69	0,79	1,45
34,7	21,6	18,5	21,6	0,78	1,14	1,49
34,1	28,9	9,8	28,9	0,62	0,82	1,60
33,3	26,1	13,3	26,9	0,70	0,91	1,51

Нуклеотидный состав ДНК ткани белого вещества мозга человека (табл. 2) схематически может быть представлен в виде следующего ряда  $Г > А > Т > Ц$ ; отношение соединений, содержащих в шестом положении аминогруппу, к содержащим шесть-кетогруппу, равно 0,70; коэффициент специфичности равен 0,91, что указывает на принадлежность этой ДНК к А — Т-типу. ДНК, также как РНК, мало отличается по нуклеотидному составу от мозга животных.

Кроме нуклеотидного состава нуклеиновых кислот ткани мозга был исследован нуклеотидный состав тотальной РНК и ее фракций и ДНК некоторых нейроэктодермальных опухолей. Контролем служил нуклеотидный состав нуклеиновых кислот белого вещества мозга человека.

Из всех опухолей мозга наибольший интерес представляло изучение нуклеиновых кислот нейроэктодермальных опухолей разной степени анаплазии астроцитарной глии, так как эти опухоли встречаются чаще всего. Для гистологического контроля мы пользовались данными патолого-анатомической лаборатории, где проводилась биопсия тех же опухолей, часть ткани которых попадала к нам.

В таблице 3 приведены данные о нуклеотидном составе РНК доброкачественных опухолей — астроцитом.

Таблица 3

## Нуклеотидный состав РНК астроцитом

Г	У	Ц	А	6-амино 6-кето	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
34,2	17,8	25,5	22,5	0,92	1,48	1,32
29,4	19,9	30,0	20,7	1,03	1,46	1,01
33,9	18,8	28,4	18,9	0,89	1,62	1,12
34,3	18,1	28,6	19,0	0,91	1,69	1,14
30,2	18,2	30,2	21,4	1,06	1,52	1,06
32,4	18,5	28,5	20,5	0,96	1,55	1,13

По содержанию отдельных нуклеотидов эта РНК не отличается от РНК мозга. Некоторые различия, имеющиеся в содержании гуанина, оказываются статистически недостоверными. Аналогичная картина наблюдается в нуклеотидном составе РНК злокачественных мультиформных спонгиобластом (табл. 4).

Таблица 4

## Нуклеотидный состав РНК мультиформных спонгиобластом

Г	У	Ц	А	6-амино 6-кето	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
36,1	17,5	24,8	21,6	0,87	1,56	1,36
28,2	20,3	32,6	18,9	0,94	1,55	0,89
27,8	18,3	38,2	15,7	1,17	1,94	0,93
34,3	15,8	27,2	22,7	0,99	1,60	1,30
33,2	18,5	27,7	20,6	0,93	1,56	1,16
31,9	18,1	30,1	19,9	0,98	1,64	1,10

Колебания в содержании отдельных нуклеотидов при сравнении с РНК мозга и астроцитом оказались статистически недостоверными.

Итак, нам не удалось найти отличий в нуклеотидном составе тотальной РНК нейроэктодермальных опухолей и белого вещества мозга.

Что касается ДНК, то мы нашли существенные различия между ее нуклеотидным составом астроцитом и мозга.

В таблице 5 представлены данные о нуклеотидном составе доброкачественных астроцитом, из которых следует, что содержание тимина в них значительно повышено по сравнению с ДНК мозга. Отношение оснований, содержащих в шестом положении аминокетогруппу к содержащим 6-кетогруппу резко снижено ( $p < 0,01$ ). Содержание гуанина в ДНК астроцитом несколько ниже, чем в ДНК мозга, но снижение оказывается статистически не-



Нуклеотидный состав ДНК астроцитом

Г	Т	Ц	А	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{Г + Ц}{А + Т}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
30,0	31,4	12,9	25,7	0,62	1,10	1,25
31,2	23,5	16,9	28,4	0,83	0,93	1,47
31,1	36,0	8,5	24,4	0,49	0,66	1,25
32,3	36,7	10,0	21,0	0,45	0,73	1,14
31,6	34,5	9,0	24,9	0,51	0,69	1,29
31,2	32,9	11,4	24,9	0,58	0,82	1,28

достоверным. Однако необходимо отметить наличие этой тенденции. По остальным показателям существенных различий в нуклеотидном составе обнаружить не удалось.

В таблице 6 приводятся данные о нуклеотидном составе ДНК мультиформных спонгиобластом.

Таблица 6

Нуклеотидный состав ДНК мультиформных спонгиобластом.

Г	А	Ц	Т	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{Г + Ц}{А + Т}$	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$
19,1	29,3	18,6	33,0	0,92	0,60	0,94
19,4	28,5	16,7	35,4	0,89	0,56	0,92
22,0	31,9	8,9	37,2	0,69	0,45	1,17
24,0	26,4	13,4	36,2	0,65	0,59	1,01
15,6	29,6	21,8	33,0	1,06	0,59	0,82
20,0	29,1	15,9	34,9	0,84	0,56	0,97

Если в случае астроцитом была отмечена только тенденция к снижению содержания гуанина, то в этих опухолях имеется резкое падение его содержания. Содержание тимина в ДНК значительно изменено: так, в ДНК ткани мозга количество тимина равно 26,1, в ДНК астроцитом — 32,9, в ДНК мультиформных спонгиобластом — 34,9. Изменение содержания гуанина и тимина в ДНК приводит к понижению отношения пуриновых оснований к пиримидиновым с 1,51 до 0,97.

Исходя из представленных данных, можно видеть, что в процессе малигнизации несколько изменяется нуклеотидный состав ДНК, причем эти изменения больше выражены в злокачественных опухолях. То, что изменения в доброкачественных и злокачественных новообразованиях имеют одинаковую направленность, дает возможность предположить, что они как-то связаны с опухолевым ростом.

Нам казалось, что имеющиеся изменения в нуклеотидном составе ДНК опухолевой ткани все же должны сопровождаться какими-то изменениями в РНК ее, поэтому решено было исследовать нуклеотидный состав высоко- и низкополимерной фракций РНК отдельно.

Фракционирование РНК производили фенольным методом Кирби-Георгиева в модификации Сквирской и Бабий для ткани нервной системы. Предварительно мы исследовали нуклеотидный состав низко- и высокополимерной РНК мозговой ткани. Полученные результаты приведены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7

Нуклеотидный состав высокополимерной РНК белого вещества мозга человека

Г	У	Ц	А	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$
20,9	22,3	32,9	23,9	0,81	1,32	1,16
26,7	21,3	32,7	19,3	0,83	1,09	1,46
29,6	16,3	35,0	19,1	0,95	1,18	1,80
25,7	19,9	33,5	20,7	0,86	1,19	1,37

Таблица 8

Нуклеотидный состав низкополимерной РНК белого вещества мозга человека

Г	У	Ц	А	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$
23,8	21,2	34,6	20,4	0,78	1,22	1,40
22,2	24,9	31,3	21,6	0,78	1,12	1,20
26,2	21,2	32,5	20,1	0,88	1,15	1,42
24,0	22,4	32,8	20,7	0,81	1,16	1,34

Как видно из этих данных, обе фракции РНК мозга человека, так же как и эти фракции мозга животных содержат преобладающее количество цитозина, их состав можно выразить следующим рядом:  $\text{Ц} > \text{Г} > \text{А} > \text{У}$ . Нуклеотидный состав высокополимерной РНК несколько отличается от низкополимерной, однако при статистической обработке эти различия не подтвердились.

Нуклеотидный состав обеих фракций РНК опухоли (табл. 9 и 10) отличается от соответствующих фракций мозга: содержание гуанилового нуклеотида в опухоли превышает таковое в нуклеиновых кислотах мозга, а содержание цитидилового нуклеотида в обеих фракциях РНК опухолей оказывается сниженным.

Таблица 9

Нуклеотидный состав высокополимерной РНК мультиформных спонгиобластом

Г	У	Ц	А	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$
31,8	21,2	29,9	17,1	0,95	0,89	1,61
28,4	19,6	30,4	21,6	1,00	1,08	1,42
28,7	23,1	32,8	15,4	0,79	0,93	1,59
31,6	17,2	33,3	17,9	0,98	1,05	1,85
33,7	16,5	29,7	20,1	1,10	0,99	1,73
30,8	19,5	31,2	18,4	0,96	0,99	1,64

Таблица 10

Нуклеотидный состав низкополимерной РНК мультиформных спонгиобластом

Г	У	Ц	А	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$	$\frac{6\text{-амино}}{6\text{-кето}}$	$\frac{\text{Г} + \text{Ц}}{\text{А} + \text{У}}$
27,3	23,5	31,2	18,0	0,83	0,97	1,41
30,4	20,5	30,0	19,6	1,00	0,99	1,22
29,3	23,1	29,7	17,9	0,89	0,91	1,44
30,2	22,8	28,4	18,6	0,95	0,89	1,42
29,2	20,5	28,2	22,1	1,05	1,01	1,34
29,2	22,0	29,5	19,2	0,94	0,95	1,36

Эти изменения в содержании нуклеотидов сказываются на отношении пуринов к пиримидинам (оно выше в опухолевой ткани) и на отношении соединений, содержащих в положении шесть аминогруппу, к соединениям, содержащим 6-кетогруппу (оно значительно ниже в опухолевой ткани по сравнению с тканью нормального мозга).

Найденные нами отличия в нуклеотидном составе ДНК и РНК в настоящее время не могут объяснить те глубокие изменения обмена веществ, которые сопровождаются или вызывают малигнизацию; они представляют интерес, показывая, что изменения в обмене нуклеиновых кислот, характерные для опухолевого роста, протекают при наличии глубоких качественных сдвигов.



## К ВОПРОСУ О ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ТКАНИ МОЗГА

Р. Г. Броун, В. П. Гончарова, Юань Хоу-Цзи

Лаборатория химии белка Физиологического института им. А. А. Ухтомского  
Ленинградского университета, Ленинград

В последнее время все яснее выкристаллизовывается представление о функциональной гетерогенности не только рибонуклеиновых кислот (РНК), но и дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) животных тканей и микроорганизмов. Однако прежде чем выдвигать такого рода предположение для нуклеиновых кислот ткани мозга, исследования которых сравнительно немногочисленны (1—7 и др.), необходимо детальное изучение их гетерогенности в физико-химическом и химическом аспектах.

Целью настоящей работы является изучение вопроса о степени гетерогенности высокополимерных препаратов ДНК и РНК, извлеченных из ткани мозга.

### Материал и методы

Объектом исследования служили препараты ДНК, полученные из цельной ткани и ядер мозга кошек комбинированным методом по Кирби (8) и Мармуру (9), и препараты РНК из ткани мозга морских свинок, полученные фенольно-детергентным методом (10), с использованием 0,1% бентонита (11). Ядра получали по методу Шово, Муле и Руйлье (12) в модификации Георгиева, Ермолаевой и Збарского (13). Введение изотопа ( $\text{NaN}_2\text{P}^{32}\text{O}_4$ ) проводили интравентрикулярно без наркоза при новокаиновой анестезии кожных покровов головы.

Фракционирование препаратов ДНК производили двумя методами: на ЭКТЕОЛА-целлюлозе по Бендичу (1) и на колонках с метилированным альбумином (МАК) по Манделю и Херши (14). Фракционирование РНК — на колонках с метилированным альбумином по Эллему и Шеридану (15). О гетерогенности фракций судили по нуклеотидному составу (для ДНК) и по включению  $\text{P}^{32}$  (для РНК).

Для характеристики полученных препаратов и фракций были использованы следующие методы: определение гиперхромического эффекта,  $E_{260}$ , молекулярного веса по вязкости (16), азота (17), фосфора (18), белка (19), РНК (20), нуклеотидного состава (21, 22).

Все спектрофотометрические определения проводились на спектрофотометре СФ-4. Для определения радиоактивности препаратов РНК использовали газоразрядный 4 П-счетчик конструкции А. И. Иванова (23.)\*

## Результаты исследований и их обсуждение

1. Фракционирование ДНК. Физико-химические характеристики ДНК, выделенных из цельной ткани и ядер мозга кошки (таблица 1), практически одинаковы и свидетельствуют о чистоте и нативности полученных препаратов.

Результаты фракционирования препаратов ДНК на колонках с ЭКТЕОЛА (рис. 1 и 2) приведены в таблице 2.

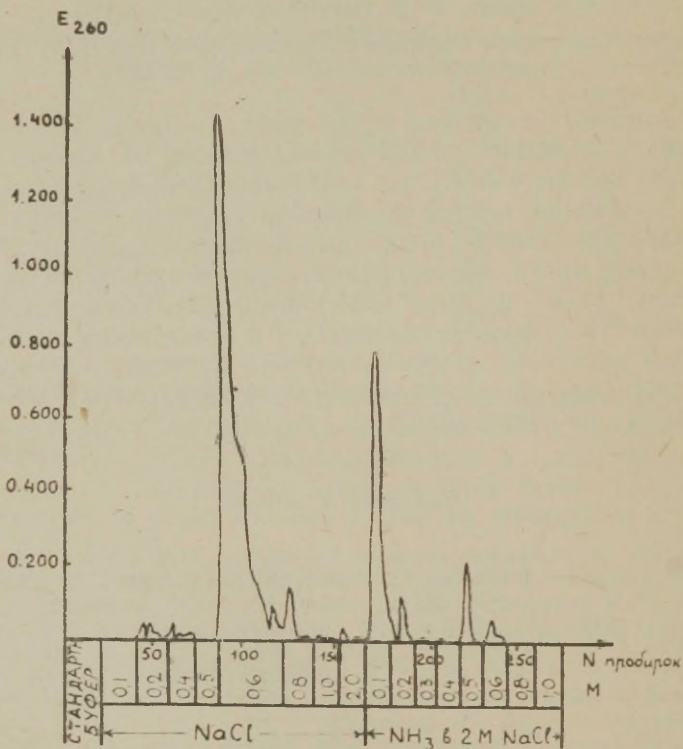


Рис. 1. Фракционирование ДНК, выделенной из ткани мозга кошки, на ЭКТЕОЛА.

\* Подробное описание методов получения и фракционирования ДНК представлено в работе Броун, Гончаровой, Юань Хоу-Цзи (24) и РНК — в работе Гончаровой и Иванова (25).

Таблица 1

Основные характеристики препаратов ДНК из цельной ткани и ядер мозга кошки

Источник получения ДНК	Колич. исслед. препарат.	Молек. вес ( $\times 10^6$ )	$\frac{E_{260}}{E_{230}}$	$\frac{E_{280}}{E_{260}}$	$E_{(p)}$	% ги-перх.* эффекта	N/P	% белка в препарате	$\frac{\text{Пур.}}{\text{Пир.}}$	$\frac{A + Ц}{Г + Т}$	$\frac{A + Т}{Г + Ц}$
Цельная ткань	6	12,8	2,40	0,54	6400	19,0	1,57	0,5	$\frac{1,05}{\pm 0,01}$	$\frac{0,98}{\pm 0,01}$	$\frac{1,36}{\pm 0,01}$
Ядра	3	13,0	2,40	0,56	6420	20,0	—	0,4	$\frac{1,06}{\pm 0,01}$	$\frac{0,98}{\pm 0,01}$	$\frac{1,40}{\pm 0,01}$

\* Определения проводились в растворе 0,15 М NaCl; 0,015 М цитрата Na, pH 7.1.



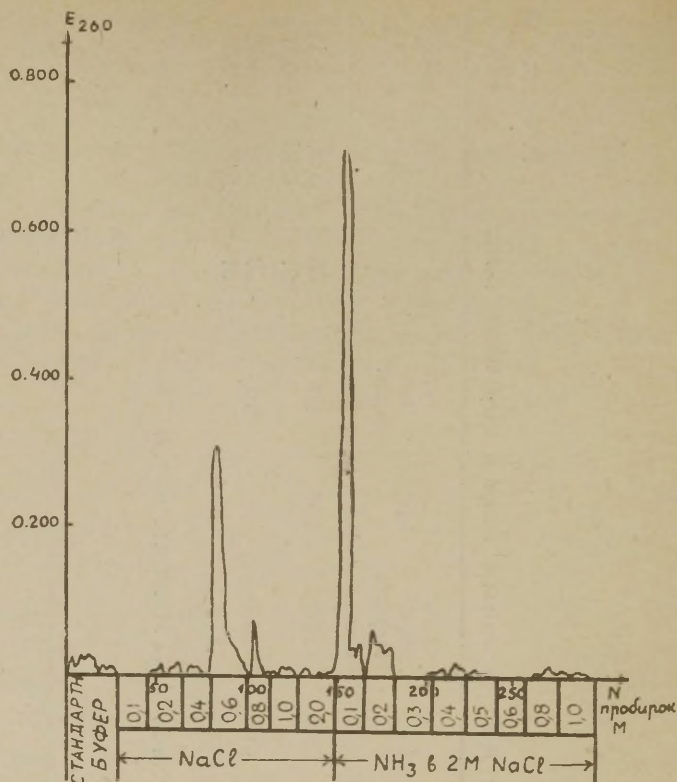


Рис. 2. Фракционирование ДНК, выделенной из ядер ткани мозга кошки, на ЭКТЕОЛА.

Таблица 2

Распределение по фракциям ДНК из цельной ткани и ядер мозга кошки при хроматографии на ЭКТЕОЛА (в %)

Элюирующие растворы	Ядра		Ткань	
	Крайние значения	Средние (из 3-х препаратов)	Крайние значения	Средние (из 6-ти препаратов)
0,6 М NaCl	28,4—32,2	30,0	40,0—46,0	43,1
0,8 М NaCl	6,0—6,8	6,3	5,2—7,0	5,8
0,1 М NH <sub>4</sub> OH	57,1—61,3	59,8	35,0—44,0	38,8
0,2 М NH <sub>4</sub> OH	2,7—3,0	2,9	4,3—7,1	6,2
0,5 М NH <sub>4</sub> OH	—	—	4,2—6,6	5,8
Выход	96,3—99,1	97,8	95,2—100	97,7

Примечание. Все аммиачные растворы готовились на 2 М NaCl.

При рассмотрении полученных данных обнаружено различное количественное распределение по фракциям для ДНК из ядер и цельной ткани. Кроме того, в ДНК из цельной ткани обнаружена одна дополнительная фракция по сравнению с ядерной ДНК. Это можно объяснить наличием в препаратах ДНК из цельной ткани цитоплазматической и, в частности, митохондриальной ДНК.

В исследуемых фракциях сохраняются практически те же отношения оптических плотностей и  $E_{(p)}$ , что и в препаратах ДНК, взятых для фракционирования (таблица 3).

Таблица 3

Отношение оптических плотностей, гиперхромический эффект и  $E_{(p)}$  во фракциях ДНК после разделения на ЭКТЕОЛА-целлюлозе

№№ фракций	Элюирующие растворы	$\frac{E_{260}}{E_{230}}$		$\frac{E_{280}}{E_{260}}$		% гиперхромического эффекта		$E_{(p)}$	
		Ткань	Ядра	Ткань	Ядра	Ткань	Ядра	Ткань	Ядра
1	0,6 М NaCl	2,27	2,22	0,54	0,53	18,0	18,0	6500	6420
2	0,8 М NaCl	2,26	2,30	0,54	0,55	18,0	18,0	—	—
3	0,1 М $NH_4OH$	2,33	2,35	0,54	0,54	17,6	17,5	6530	6510
4	0,2 М $NH_4OH$	2,27	2,25	0,55	0,54	17,0	17,0	—	—
5	0,5 М $NH_4OH$	2,26	—	0,53	—	17,7	—	—	—
Исходные препараты		2,40	2,40	0,54	0,56	19,0	20,0	6400	6420

Изолированные фракции ДНК освобождались от солей и аммиака гельфильтрацией на сефадексе Г-75 и после упаривания подвергались гидролизу. В гидролизатах определялся нуклеотидный состав методом распределительной хроматографии на бумаге в сочетании с ультрафиолетовой спектрофотометрией. Результаты этих определений приведены в таблице 4.

Из приведенных данных (таблица 4) отчетливо видно, что отношение пуринов к пиримидинам и 6-аминогрупп к 6-кетогруппам подчиняется правилу Чаргаффа. Величины коэффициента специфичности для каждой из фракций оказались неодинаковыми и заметно отличались от соответствующих величин, найденных для исходных препаратов ДНК. С увеличением концентрации хлористого натрия элюирующих растворов и увеличением рН в них наблюдается возрастание коэффициента специфичности элюируемых ДНК от 1,16 до 1,63 для ДНК цельной ткани и от 1,19 до 1,47 для ДНК из ядер. Такая же закономерность наблюдалась и при фракционировании ДНК на МАК.

Молярные соотношения азотистых оснований во фракциях ДНК, полученных при разделении на ЭКТЕОЛА (средние значения)

№№ фракций	Элюирующие растворы	$\frac{A + G}{C + T}$		$\frac{A + C}{G + T}$		$\frac{A + T}{G + C}$	
		Ткань	Ядра	Ткань	Ядра	Ткань	Ядра
1	0,6 М NaCl	1,04	1,05	0,99	0,97	1,16	1,19
2	0,8 М NaCl	1,06	1,03	0,97	0,97	1,33	1,32
3	0,1 М NH <sub>4</sub> OH	1,05	1,03	0,98	0,97	1,48	1,47
4	0,2 М NH <sub>4</sub> OH	1,05	*	0,97	*	1,56	*
5	0,5 М NH <sub>4</sub> OH	1,04	*	0,98	*	1,63	*
Исходные препараты		1,05	1,06	0,98	0,98	1,36	1,40

Полученные данные статистически обработаны.

\* Не обозначены те случаи, где из-за недостатка материала нельзя было определить нуклеотидный состав.

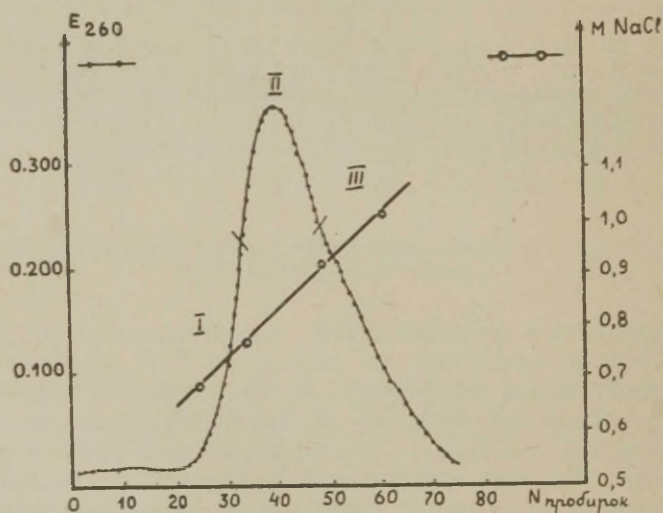


Рис. 3. Фракционирование ДНК, выделенной из ткани мозга кошки, на колонке МАК.

Как видно из рис. 3, при градиентной элюции возрастающими концентрациями хлористого натрия (от 0,4 до 1,2 М NaCl) ДНК элюируется одним пиком в пределах от 0,67 до 1,1 М NaCl. В зависимости от положения на элюционном профиле (как указано на рис. 3) можно уловить четкие различия в ну-



клеотидном составе отдельных групп ДНК — I, II, III (таблица 5).

Таким образом, путем фракционирования суммарных препаратов ДНК, полученных как из цельной ткани мозга, так и из ядер, на ЭКТЕОЛА-целлюлозе и на метилированном альбумине

Таблица 5

Молярные соотношения азотистых оснований в трех группах элюатов ДНК из цельной ткани мозга кошки, полученных при фракционировании на МАК (средние данные 8 опытов)

Группа элюатов	Средняя концентрация NaCl в группах элюатов (в молях)	$\frac{A + Г}{Ц + Т}$	$\frac{A + Ц}{Г + Т}$	$\frac{A + Т}{Г + Ц}$
1	0,76	0,98	1,00	1,15
2	0,84	1,00	0,95	1,24
3	0,95	1,04	1,02	1,42

обнаружена отчетливая гетерогенность препаратов и выявлен широкий спектр распределения отдельных групп ДНК по нуклеотидному составу.

Б. Фракционирование РНК. Элюионный профиль РНК, полученный на МАК при градиентной элюции возрастающими концентрациями NaCl (от 0,4 до 1,5 М) при 35°C, представлен на рис. 4. При указанных условиях выход с колонки составляет 90—97% от внесенного препарата. Были выявлены ( $E_{260}$  ммк) следующие фракции: транспортные РНК (11—18 пробы) и рибосомальные РНК (21—32 пробы). В количественном отношении (в среднем из 12 опытов) первая фракция составляет около 20% и вторая — 80% от элюируемой РНК.

При рассмотрении профиля радиоактивности (пробы 9—40) не выявляется параллелизма с пиками, обнаруженными спектрофотометрически. Как видно из рисунка 4, фракция с наиболее высокой относительной активностью элюируется в области между т-РНК и р-РНК (16—22 пробы), а также вправо от рибосомальной РНК (27—40 пробы).

В связи с тем, что при описанных выше условиях не удалось получить полного выхода РНК с колонки, мы воспользовались приемом, предложенным Элеммом и Шериданом ( $\rightarrow 15 \leftarrow$ ), позволяющим при повышении температуры раствора хлористого натрия (1,5 М) от 35° до 90°C элюировать РНК, особенно прочно связанную с МАК и составляющую, по мнению авторов, основную массу информационной РНК.

Профиль радиоактивности, полученный при «горячей» элюции, представлен на рис. 4 пробами 40—60. Для препаратов

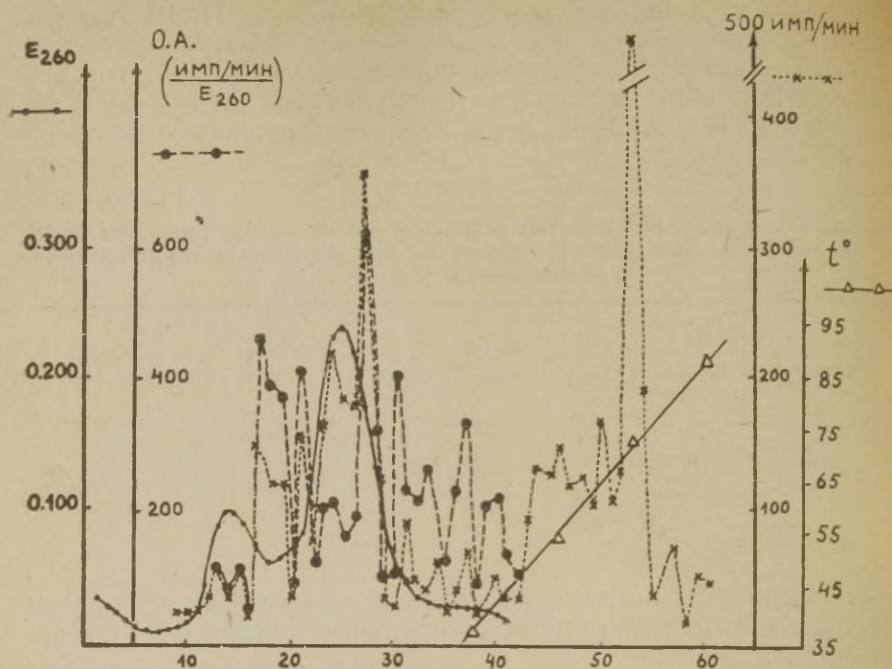


Рис. 4. Фракционирование РНК, выделенной из ткани мозга морской свинки, на колонке МАК (РНК извлекалась через 2,5 часа после введения животным изотопа).

РНК, полученных через 2,5 часа после введения животным изотопа, в этой части элюиционного профиля обнаруживается около 48% и для препаратов с 18—20-часовой экспозицией — около 25% всей радиоактивности, снятой с колонки.

Что касается спектрофотометрических данных, то в этих условиях они не могут быть получены, так как при повышении температуры элюирующего раствора вымывается мелкодисперсный материал самой колонки, поглощающий в ультрафиолете.

Таким образом, РНК суммарных препаратов мозга морских свинок, помимо т-РНК и р-РНК, представлена гетерогенным набором быстрометящихся РНК.

Вопрос о значении гетерогенности нуклеиновых кислот ткани мозга представляет особый интерес. Как известно, в течение последних лет опубликованы исследования, связывающие ряд функций мозга и, в частности, функцию памяти с высокополимерной РНК (26, 27, 28 и др.). Не останавливаясь на деталях этих исследований, следует отметить, что одной из проблем, возникающих в этой связи, является проблема длительного существования высокополимерной РНК — «памяти», РНК, в общем

менее стабильной, чем ДНК. Естественно было бы ожидать, что некоторые формы именно ДНК, а не РНК, являются высокостабильным субстратом памяти. В принципе можно допустить синтез ДНК «памяти» на матрице РНК «памяти», так как в настоящее время уже имеются экспериментальные данные о возможности синтеза ДНК на матрице РНК (29). Не так давно такое предположение представлялось бы маловероятным, так как оно требует допущения о существовании в нервной ткани особой формы «негенетической» ДНК. Однако появившиеся к настоящему времени данные о существовании не только химической, но и функциональной гетерогенности ДНК в ряде тканей (30) заставляют серьезно обсуждать такую возможность.

Мы приводим эти соображения лишь как иллюстрацию важности проблем, с которыми могут быть в последующем связаны факты, установленные в настоящем исследовании.

### Выводы

1. При фракционировании на ЭКТЕОЛА препараты ДНК, полученные из цельной ткани мозга кошки, разделяются на пять фракций, препараты ДНК из ядер мозга кошки — на четыре фракции.

2. Независимо от способа фракционирования (ЭКТЕОЛА, МАК) с повышением концентрации хлористого натрия и рН элюирующих растворов возрастает коэффициент специфичности элюируемых ДНК.

3. При фракционировании на метилированном альбумине препаратов РНК из мозга морских свинок, помимо т-РНК и р-РНК, обнаружен гетерогенный набор быстрометящихся РНК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bendich A., Pahl H., Beiser S., Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., **21**, 31, 1956.
2. Kit S., Biochim. Biophys. Acta, **51**, 198, 1961.
3. Kondo N., Osawa S., Nature, **183**, 4675, 1603, 1959.
4. Mandel P., Borowski T., J. Neurochem., **8**, 2, 126, 1961.
5. Борковский Т., Междунар. симпоз. по функц. биохимии нервной системы, Л., 1965.
6. Мандель П., Междунар. симпозиум по функцион. биохимии нервной системы, Л., 1965.
7. Singh U., Canadion. J. of biochem., **43**, 7, 1083, 1965.
8. Kirby K., Biochem. Biophys. Acta., **66**, 3, 1957.
9. Margur T., J. Molec. Biol., **3**, 2, 208, 1961.
10. Смирнов В., Мазуров В., Гончарова В., Смирнов В., Шкаренкова Л., Вопросы мед. химии, **10**, 3, 305, 1964.
11. Fraenkel-Conrat, B., Singer, Tsugita, Virology, **14**, 54, 1961.
12. Chauveau J., Moule V., Ruiller., Bull. Soc. chim. biol., **39**, 1521, 1958.



13. Георгиев Г., Ермолаева Л., Збарский И., Биохимия, 15, 318, 1960.
14. Mandel J., Hershey A., *Analyt. biochem.*, 1, 66, 1960.
15. Ellem K., Sheridan J., *Biochem. biophys. res. comm.*, 6, 6, 505, 1964.
16. Крэг А., Аналитические методы белковой химии, 239, ИЛ, М., 1963.
17. Conway E., Wyrne A., *Biochem.*, 27, 2, 419, 1933.
18. Венкстерн Т., Баев А., Биохимия, 22, 6, 8, 1957.
19. Lowry O., Robebrowgh N., Farr A., Randall R., *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
20. Мейбаум В., Биохимия, 10, 4, 353, 1945.
21. Уайатт Г., Нукленновые кислоты. ИЛ, М., 443, 1957.
22. Броун Р., Гончарова В., Краснопевцев Н., Труды третьей всесоюзн. конферен. по биохимии нервной системы, 339, Ереван, 1963.
23. Иванов А., Новости мед. техники, 6, 61, 1960.
24. Броун Р., Гончарова В., Юань Хоу-Цзи, Укр. биохим. ж., 403, 280, 1968.
25. Гончарова В., Иванов А., ДАН СССР, 173, 6, 1967.
26. Hyden H., Egyhazi E., *Proceed. Natl. Acad. Sci.*, 52, 4, 1030, 1964.
27. Dingman W., Sporn M., *Science*, 144, 26, 1964.
28. Rose S., *Discovery*, 25, 4, 38, 1964.
29. Lee Huang, Cavalieri L., *Proceed. Natl. Acad. Sci.*, 50, 6, 116, 1963.
30. Шмерлинг Ж., Успехи совр. биол., 59, 1, 33, 1965.

## ИЗУЧЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

М. И. Прохорова, А. А. Липская, Г. П. Соколова, С. Ю. Туманова,  
М. А. Флеров

Лаборатория биохимии нервной системы Института им. А. А. Ухтомского  
Ленинградского университета, Ленинград

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) находит все большее и большее применение в биохимических исследованиях. За последнее время опубликованы многочисленные исследования, выполненные с применением метода ТСХ. Имеется ряд монографий и обзорных статей, посвященных ТСХ (1, 2). Этот метод значительно расширяет наши возможности более углубленного изучения ряда биохимических процессов, лежащих в основе физиологических функций. Это прежде всего относится к липидам головного мозга, входящим в структурные элементы нервных клеток.

Тонкослойная хроматография пригодна для изучения качественного анализа разнообразных липидов мозга, для разделения на фракции с последующим определением количественного содержания их, а также для препаративного выделения отдельных фракций. Это особенно важно при работе с радиоактивными веществами, так как для определения У. А. отдельных фракций липидов часто требуются относительно большие количества исследуемых веществ (0,5—2,0 мг).

В настоящей работе метод ТСХ был применен Г. П. Соколовой при изучении свободных жирных кислот, М. А. Флеровым — глицеридов, А. А. Липской — фосфолипидов и С. Ю. Тумановой — ганглиозидов головного мозга. Для качественной, количественной и препаративной ТСХ в качестве сорбента авторами использовался отечественный силикагель КСК. Опыты проводились на белых крысах весом 100—120 г.

Общая фракция липидов головного мозга извлекалась по способу, предложенному Фолчем и его сотрудниками (3, 4).

# 1. Свободные жирные кислоты, глицериды и фосфолипиды головного мозга

Для разделения общей фракции липидов головного мозга на моно-, ди- и триглицериды, свободные жирные кислоты и фосфолипиды нами был использован метод, предложенный Фриманом и Уэстом (5). Этим методом разделение общей фракции липидов мозга производилось на тонком слое силикагеля двумя системами растворителей: первой, состоящей из диэтилового эфира, бензола, этанола и уксусной кислоты (40:50:2:0,2), и второй — из диэтилового эфира и гексана (6:94). Для обнаружения отдельных фракций были применены различные проявители: пары  $I_2$ , концентрированная  $H_2SO_4$ , фосфорномолибденовая кислота и другие; во всех случаях обнаруживалось 7 пятен. Для идентификации пятен в качестве свидетелей нами были использованы следующие вещества: для моноглицеридов — моностеарин, для свободных жирных кислот — пальмитиновая и олеиновая кислоты, для диглицеридов — дипальмитин, для триглицеридов — трипальмитин; холестерин определялся по реакции на холестерин и фосфолипиды — по реакции на фосфор. Одновременно определялись величины  $R_f$  отдельных фракций; различия между ними, кроме 2-й и 3-й фракций, оказались статистически достоверными. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1  
Величины  $R_f$  отдельных фракций липидов головного мозга

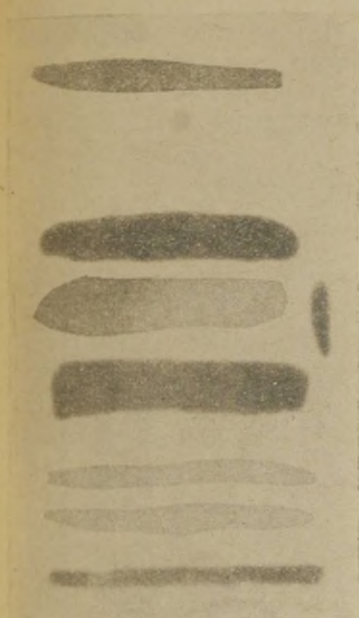
№№ пп.	Фракции						
	1-я *	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я
1	—	0,14	0,24	0,49	0,61	0,78	0,90
2	—	0,23	0,27	0,55	0,72	0,76	1,00
3	—	0,13	0,17	0,40	0,53	0,63	0,95
4	—	0,09	0,14	0,38	0,52	0,63	0,96
5	—	0,11	0,16	0,36	0,46	0,63	0,84
		0,14± 0,04	0,20± 0,05	0,44± 0,07	0,59± 0,08	0,67± 0,08	0,93± 0,05

\* 1-я фракция фосфолипидов оставалась на старте.

Идентификация отдельных пятен с помощью свидетелей и цветных реакций, а также величины  $R_f$  их позволили сделать вывод о том, что 1-я фракция содержит фосфолипиды, 2-я — моноглицериды; 3-я — свободные жирные кислоты; 4-я — холестерин; 5-я — диглицериды; 6-я — триглицериды и 7-я фракция не идентифицирована (см. рис. 1).



Разделение общей фракции липидов мозга методом тонкослойной хроматографии

	№№ пп.	$R_f$	Название фракций
	7	0,93	неидентифицированная фракция
	6	0,67	триглицериды
	5	0,59	диглицериды
	4	0,44	холестерин
	3	0,20	свободные жирные кислоты
	2	0,14	моноглицериды
	1	—	фосфолипиды

Примечание. По месту расположения 7-е пятно относится к эфирам холестерина. Однако в этом пятне не всегда удавалось обнаружить наличие холестерина. Кроме того, окончательно не выяснено, имеются ли эфиры холестерина в головном мозгу, поэтому 7-е пятно можно считать неидентифицированным.

Свободные жирные кислоты в головном мозгу изучены крайне мало, поэтому они и явились предметом наших исследований. Жирные кислоты, входящие в состав липидов мозга, составляют 20—22% всего сухого остатка мозговой ткани и характеризуются исключительным разнообразием. Однако число жирных кислот, входящих в липиды мозга, в настоящее время окончательно не установлено. Оно, вероятно, не менее 25—30. Столь большое разнообразие жирных кислот в липидах мозга, по-видимому, является существенным моментом, определяющим гетерогенность многих представителей липидов: фосфолипидов, гликолипидов и т. д. Что же касается свободных жирных кислот, то литературных данных о содержании и интенсивности обмена их в мозговой ткани имеется крайне мало.

Содержание свободных кислот определялось методом Ауерса (6) в модификации Дюнкомбе (7). При пересчете на эквивалент стеариновой кислоты их содержание в среднем равно 1,0—2,0 мкмоль на 1 г ткани мозга, т. е. 30—60 мг%. По отношению ко всем жирным кислотам, входящим в состав липидов мозга, они составляют 1,0—1,5%. Как видно, содержание свободных жирных кислот в головном мозгу невелико.

Анализируя состав свободных жирных кислот мозга методом газовой хроматографии («Хром-2»), Г. П. Соколова обнаружила их в количестве 17. На рис. 2 приводится хроматограмма свободных жирных кислот мозга. Данные о содержании свободных жирных кислот в головном мозгу представлены в табл. 2.

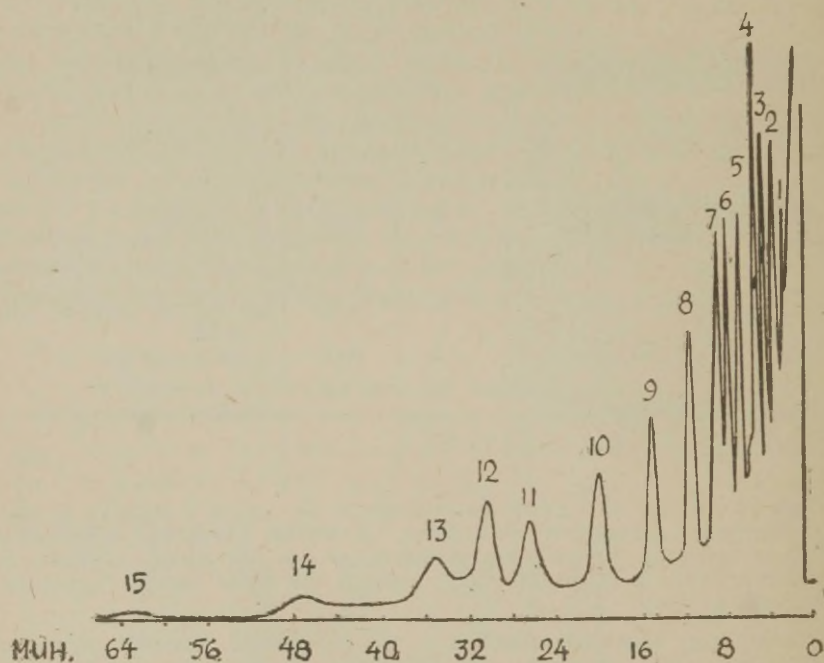


Рис. 2. Хроматограмма свободных жирных кислот, полученная методом газовой хроматографии.

1 — лауриновая кислота; 2 — —————; 3 — миристиновая кислота; 4 — —————; 5 — пальмитиновая кислота; 6 — пальмитоолеиновая кислота; 7 — стеариновая кислота; 8 — олеиновая кислота; 9 — линолевая кислота; 10 — —————; 11 — линоленовая кислота; 12 — —————; 13 — арахидоновая кислота; 14 — —————; 15 — церотиновая кислота.

За последнее время глицериды в животном организме стали предметом детального изучения, особенно в печени и в жировой ткани. Напротив, исследований, посвященных глицеридам мозга, крайне мало. До сих пор нет достаточно точных сведений

## Содержание отдельных свободных жирных кислот в головном мозгу

№№ пп	Название	Кол-во «С» и двойных связей в отдельных кислотах	Содержа- ние в мг%	% отноше- ния
1	лауриновая	12 : 0	—	следы
2*	—	—	0,5	1,3
3	миристиновая	14 : 0	1,8	4,0
4*	—	—	2,1	4,6
5	пальмитиновая	16 : 0	5,5	11,1
6	пальмитоолеиновая	16 : 1	3,3	6,9
7	стеариновая	18 : 0	3,8	7,7
8	олеиновая	18 : 1	5,7	11,3
9	линолевая	18 : 2	4,2	8,6
10*	—	20 : 0	—	следы
11	линоленовая	18 : 3	3,7	7,6
12*	—	—	4,3	8,3
13	арахидиновая	20 : 4	3,6	7,1
14*	—	—	4,7	8,7
15	арахиновая	20 : 0	4,6	8,6
16*	—	—	1,8	3,2
17	церотиновая	26 : 0	0,6	1,1

\* №№ 2, 4, 10, 12, 14 и 16 — жирные кислоты неидентифицированы.

о количественном содержании глицеридов в головном мозгу. Не изучены предшественники, из которых синтезируются глицериды, а также интенсивность обмена моно-, ди- и триглицеридов и их связь с фосфолипидами в головном мозгу. Все это побудило нас приступить к изучению глицеридов мозга.

Количественное содержание глицеридов, как правило, определяется по глицерину, входящему в состав глицеридов. М. А. Флеровым был использован метод Ламберта и Нейша в модификации Карлсона (8). Этот метод основан на гидролизе глицеридов с образованием свободного глицерина и жирных кислот; затем глицерин окисляют до формальдегида. Последний с хромотропной кислотой образует окрашенное соединение, которое количественно определяется спектрофотометрически (СФ-4а) при 570 мкм. Этот метод позволяет определять количество глицерина в пробе 2—10 мкг. Исходя из состава глицеридов, в которых глицерин составляет 10—11%, нами установлено, что содержание ди- и триглицеридов в головном мозгу в среднем равно  $0,26 \pm 0,07\%$ . Относительно количества моноглицеридов в мозгу мы пока не располагаем точными данными.

Одновременно с хроматографическим разделением (9, 10) и определением содержания глицеридов и свободных жирных кис-




лот определялась У.А. моно-, ди- и триглицеридов, свободных жирных кислот и фосфолипидов. В качестве источников синтеза исследуемых фракций липидов были использованы радиоактивные препараты (ацетат-2- $C^{14}$  и ацетат-1- $C^{14}$ ), которые вводились подкожно из расчета 30 мккюри на 100 г веса животного. Продолжительность радиоактивной экспозиции при изучении свободных жирных кислот и глицеридов была 15—30 мин. и фосфолипидов — 30—60 мин.

Для получения фосфолипидов использовали общую фракцию липидов головного мозга, извлеченную по способу Фолча и сотрудников (4). Липидный экстракт мозга разгоняли на тонком слое силикагеля в системе растворителей: диэтилэфир-ледяная уксусная кислота-гексан (25:2:73); в этой системе растворителей фосфолипиды остаются на старте. Фосфолипиды из тонкого слоя силикагеля извлекались хлороформ-метанолом (2:1), полученный экстракт, содержащий фосфолипиды, упаривался и производилось разделение фосфолипидов на отдельные фракции

Рис. 3

Разделение фосфолипидов на фракции методом тонкослойной хроматографии (хлороформ-метанол- $NH_3$  12:7:1)

	№/п	Rf	название фракций
	6	0,82	фракция «6» (неидентиф.)
	5	0,65	фосфатидилэтаноламин
	4	0,45	фосфатидилхолин
	3	0,32	сфингомиелин
	2	0,19	фосфатидилсерин
	1	0,07	фракция «I»

в системе растворителей хлороформ-метанол- $\text{NH}_3$  (12:7:1), предложенной Скиморе и Энтеманом (11). В данной системе растворителей фосфолипиды делятся на 6 фракций (12, 13).

Идентификация отдельных фракций производилась по цветным реакциям (с фосфорномолибденовой кислотой, молибденом, парами  $\text{I}_2$ , нингидрином, азотнокислым висмутом); в качестве свидетелей были также использованы препараты сфингомиелина и лецитина. Сопоставляя полученные результаты с величинами  $R_f$  для отдельных пятен и с имеющимися литературными данными, нами было установлено расположение отдельных фракций на хроматограмме (см. рис. 3), а именно: второе пятно ( $R_f = 0,19$ ) соответствует фосфатидилсерину; третье пятно ( $R_f = 0,32$ ) — сфингомиелину; четвертое ( $R_f = 0,45$ ) — фосфатидилхолину и пятое пятно ( $R_f = 0,65$ ) — фосфатидилэтаноламину. Одновременно с хроматографическим разделением на тонком слое силикагеля определялись количество и У.А. фосфатидилсерина, сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Что же касается первой фракции ( $R_f = 0,07$ ) и шестой ( $R_f = 0,82$ ), то они нами не были идентифицированы. На основании  $R_f$  можно только предположить, что в первом пятне содержатся фосфатидные кислоты, а в шестом — фосфоинозитиды. Это подтверждается также и тем, что У.А. этих фракций более высокая, чем У.А. других фракций фосфолипидов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Содержание и У.А. отдельных фракций фосфолипидов головного мозга

№№ пп	Фракции	Содержание в % к общей фракции фосфолипидов	У. А. (имп/мин/мл)
1	Фракция 1-я	2,2	$146 \pm 12$
2	Фосфатидилсерин	11,6	$31 \pm 4$
3	Сфингомиелин	6,7	$10 \pm 2$
4	Фосфатидилхолин	40,0	$100 \pm 13$
5	Фосфатидилэтаноламин	36,3	$59 \pm 7$
6	Фракция 6-я	3,2	$196 \pm 6$

Наибольшей У.А. характеризовались 1-я и 6-я фракции, затем по степени снижения У.А. отдельных фракций их можно расположить в такой последовательности: фосфатидилхолин > фосфатидилэтаноламин > фосфатидилсерин > сфингомиелин.

Определение У.А. свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицеридов проводилось с целью выяснения вопроса — являются ли свободные жирные кислоты предшественниками гли-

церидов, а глицериды в свою очередь предшественниками фосфолипидов головного мозга. Данные об У.А. свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицеридов и отдельных фракций фосфолипидов представлены на рис. 4 и 5.

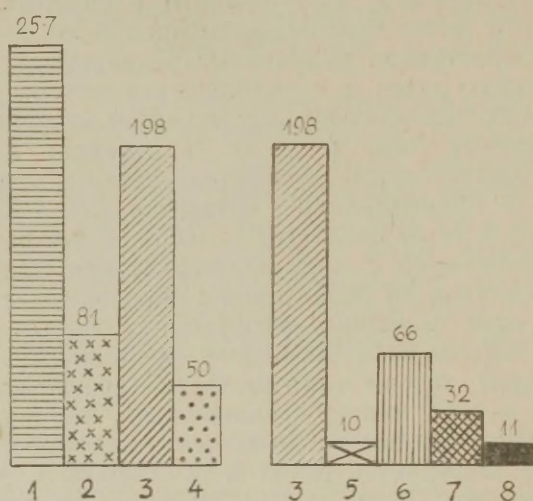


Рис. 4. Удельная активность свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицеридов и отдельных фракций фосфолипидов.

1 — свободные жирные кислоты; 2 — моноглицериды; 3 — диглицериды; 4 — триглицериды; 5 — сфингомиелин; 6 — фосфатидилхолин; 7 — фосфатидилэтаноламин; 8 — фосфатидил-серин.

Как видно из рис. 4, У.А. свободных жирных кислот выше отдельных фракций глицеридов. Следовательно, свободные жирные кислоты могут быть предшественниками моно-, ди- и триглицеридов. В свою очередь диглицериды могут являться предшественниками синтеза отдельных фракций фосфолипидов.

На основании наших исследований можно представить биосинтез свободных жирных кислот моно-, ди- и триглицеридов и отдельных фракций фосфолипидов в головном мозгу в следующем виде (см. рис. 5)\*.

\* Примечание. У.А. ацил-КоА и фосфатидных кислот нами не определялась. В отношении других органов, в частности печени, рядом исследователей было показано (14—17), что диглицериды и фосфатидные кислоты являются предшественниками отдельных фракций фосфолипидов.



## СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

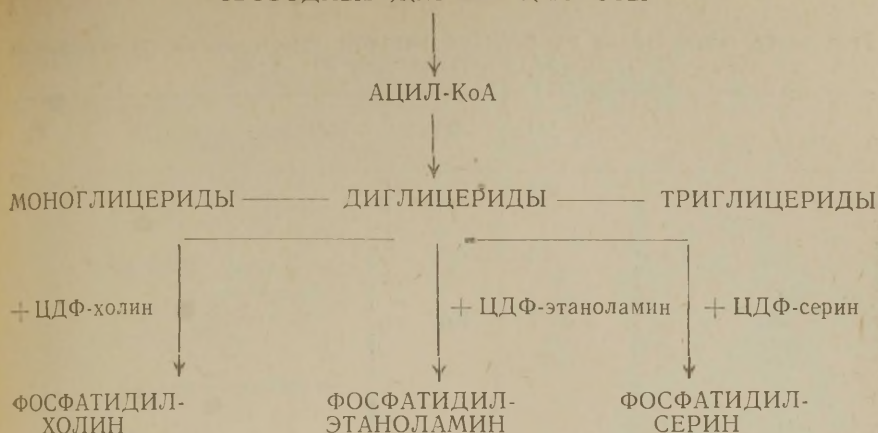


Рис. 5. Схема биосинтеза свободных жирных кислот, глицеридов и фосфолипидов.

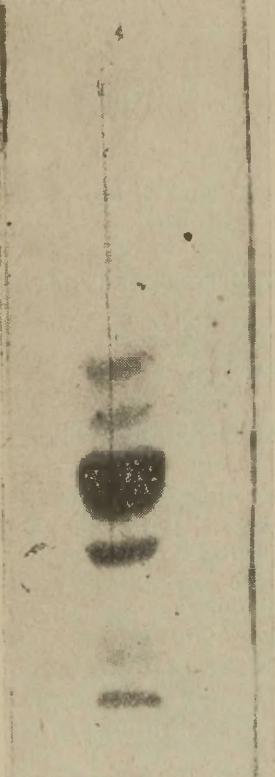
## 2. Ганглиозиды головного мозга и их физиологическая роль

Разделение ганглиозидов мозга взрослых крыс производилось также методом тонкослойной хроматографии. Ганглиозиды на тонком слое силикагеля разделялись в системе хлороформ-метанол-вода (60:35:8). Проявление отдельных фракций ганглиозидов было осуществлено рядом специфических реагентов на N-ацетилнейраминую кислоту; наиболее чувствительным оказался способ проявления резорциновым реактивом в атмосфере паров соляной кислоты при температуре 120°С. Ганглиозиды на тонком слое силикагеля КСК делились, как правило, на 8 фракций. Данные представлены на рис. 6.

Трисialogанглиозиды, содержание которых в среднем равно 20%, делятся на 2 фракции. Содержание дисialogанглиозидов 67%, делятся они на 3 фракции. Минимальное количество приходится на долю моносиialogанглиозидов, всего 13%, они как правило делятся на 3 фракции.

Вопрос о гетерогенности ганглиозидов можно считать решенным; это показано также рядом другим авторов (18—23). Однако сколько фракций в ганглиозидах мозга, ответить довольно трудно, так как гетерогенность их определяется числом N-ацетилнейраминовой кислоты, входящей в один мономер, содержанием отдельных компонентов в мономерах. На гетерогенность ганглиозидов вероятно влияет также количество мономеров, входящих в молекулу ганглиозидов.

Разделение ганглиозидов на фракции методом тонкослойной хроматографии  
(хлороформ-метанол-вода 60 : 35 : 8)

	№/п	Rf	Название фракций	%
	8	0,71	} моносиалоганглиозиды	13
	7	0,67		
	6	0,52		
	5	0,43	} дисиалоганглиозиды	67
	4	0,33		
	3	0,25		
	2	0,14	} трисиалоганглиозиды	20
	1	0,05		

При изучении интенсивности обмена ганглиозидов были также использованы радиоактивные препараты: ацетат- $C^{14}$  и глюкоза- $C^{14}$ . Ацетат- $C^{14}$  вводился из расчета 30 мккюри/100 г веса животного, глюкоза- $C^{14}$  — 20 мккюри/100 г веса. Было установлено, что как общая фракция ганглиозидов, так и отдельные фракции характеризуются интенсивным обменом, особенно моносиалоганглиозиды (7 и 8 фракции). По нашим данным оказалось, что интенсивность обмена ганглиозидов близка к интенсивности обмена гликогена, который в головном мозге является преимущественно энергетическим веществом и характеризуется высоким обменом (24). В таблице 4 приводятся данные У.А. отдельных фракций липидов и гликогена головного мозга.

У.А. гликогена и отдельных фракций липидов головного мозга взрослых крыс при введении ацетата-С<sup>14</sup> и глюкозы-С<sup>14</sup>

Фракции	Ацетат-С <sup>14</sup>	Глюкоза-С <sup>14</sup>
Общая фракция липидов	27	15
Холестерин	2—3	—
Общая фракция фосфолипидов	38	18
"    "    цереброзидов	13	9
"    "    ганглиозидов	221	367
Моносиалоганглиозиды	396	493
Гликоген	490	950

Таким образом, ганглиозиды являются активно метаболизирующими пластическими веществами нервной ткани. Это, по-видимому, определяется их физиологической ролью.

За последнее время ганглиозидам мозга посвящено много исследований, а также высказан ряд предположений об их физиологической роли, благодаря которым проливается свет на участие ганглиозидов в проведении нервных импульсов.

Интерес к ганглиозидам особенно возрос после того, как Богоч (25) установил, что препараты ганглиозидов вызывают увеличение амплитуды, силы и скорости сокращения сердечной мышцы. В дальнейшем Мак-Ильвейну и сотр. (26—29) удалось показать, что ганглиозиды преимущественно сосредоточены в мембранных элементах нейронов, включая и дендриты; принимают участие в транспорте ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Кроме того, Мак-Ильвейн (27), Кун и др. (30), Ярнефельт (31), используя метод дифференциального центрифугирования, установили, что в микросомальной фракции нейрона вместе с ганглиозидами содержится фермент АТФаза. При этом Ярнефельт (32) наблюдал, что при повышении содержания ганглиозидов, а следовательно, и увеличении свободных анионных групп имеет место более интенсивный перенос ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, повышение активности АТФазы. Напротив, при инаktivации ганглиозидов активность микросомальной АТФазы снижается.

Кроме того, за последнее время были получены данные о топографической и функциональной связи между ганглиозидами и АХ (33—35). Все это дало основание авторам полагать, что ганглиозиды, являясь преимущественно мембранными компонентами серого вещества головного мозга, обеспечивают специфическую функцию нейрона, а именно, участвуют в проведении нервных импульсов.

В исследованиях, проведенных многочисленными авторами (20, 21, 30, 36—38), было установлено, что ганглиозиды пред-



ставляют собой сложные высокомолекулярные полимерные соединения, состоящие из отдельных мономеров. В каждом мономере содержится от 1 до 3 молекул N-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты), которые занимают концевое или боковое положение в молекуле ганглиозидов. В зависимости от числа N-ацетилнейраминовой кислоты, отдельные ганглиозиды носят название моносиалоганглиозидов, дисиалоганглиозидов и трисиалоганглиозидов (20, 21). Богоч (36) и Гаммак (37) на основании определения вязкости, диффузии и седиментации установили, что молекулярный вес (МВ) ганглиозидов колеблется в пределах  $2,5 \cdot 10^5 - 4,0 \cdot 10^5$ . Это определяется числом мономеров, входящих в молекулу ганглиозидов, которое изменяется от 125 до 200.

Все это явилось доказательством участия свободных анионных групп N-ацетилнейраминовой кислоты ганглиозидов в переносе ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Поэтому нас особенно интересовал вопрос, в какой мере с количественной стороны ганглиозиды мозга могут обеспечить транспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Перед нами встал вопрос о количестве свободных анионных групп в ганглиозидах в одном нейроне и в 1 г ткани мозга. Это можно определить, зная МВ ганглиозидов, число свободных анионных групп в мономере и содержание ганглиозидов в 1 г мозговой ткани. По нашим данным, содержание ганглиозидов равно 120—140 мг % (38, 40).

Число свободных анионных групп (X), содержащихся в одном г мозговой ткани, можно определить следующим образом:

$$X = \frac{N \cdot d \cdot n}{\text{МВ}} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot 1,2 \cdot 414}{4 \cdot 10^5 \cdot 10^3} = 7,5 \cdot 10^{17},$$

где

N — число Авогадро —  $6,02 \cdot 10^{23}$ ,

d — содержание ганглиозидов в 1 г мозговой ткани — 1,2 мг,

n — число свободных анионных групп в молекуле ганглиозидов — 414,

МВ — молекулярный вес ганглиозидов —  $4 \cdot 10^5$ .

Что же касается свободных анионных групп в нейроне ( $X_1$ ), то оно будет равным  $X_1 = \frac{X}{n} = \frac{7,5 \cdot 10^{17}}{2,1 \cdot 10^7} = 3,6 \cdot 10^{10}$ ,

X — число свободных анионных групп в 1 г мозговой ткани ( $7,5 \cdot 10^{17}$ ),

n — число нейронов в 1 г мозговой ткани —  $2 \cdot 10^7$ .

Более подробное рассмотрение этого вопроса представлено в нашей работе (41).

Таким образом, число свободных анионных групп из расчета на 1 г мозговой ткани равно  $7,5 \cdot 10^{17}$ , а на один нейрон —  $3,6 \cdot 10^{10}$ . В работе Вольфа (42) приводится количество свободных анионных групп N-ацетилнейраминовой кислоты в одном

нейроне человека, равное  $10^{11}$ . Если учесть, что размеры нейронов в мозгу человека больше, чем у крысы, то данные, полученные нами и Вольфом (42) довольно близки друг к другу, особенно если произвести расчет на 1 г мозга (табл. 5).

Таблица 5

Количество свободных анионных групп N-ацетилнейраминовой кислоты ганглиозидов в одном нейроне и в 1 г ткани мозга

Головной мозг	Число нейронов в 1 г мозга	Кол-во свободных анионных групп в нейроне	Кол-во свободных анионных групп в 1 г мозга
человека	$10^7$	$10^{11}$	$10^{18}$
крысы	$2 \cdot 1 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^{10}$	$7,50 \cdot 10^{17}$

Работами ряда исследователей (43—46) было установлено, что для развития нервного импульса необходимо изменение мембранного потенциала не менее чем на 100 мв. При этом подсчитано (46), что при изменении мембранного потенциала на 100 мв/см<sup>2</sup> необходимо обеспечить перенос ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в количестве  $10^{-12}$  моль, т. е.  $6,0 \cdot 10^{11}$  одновалентных ионов.

Для возникновения импульса во всех нейронах необходимо знать поверхность всех нейронов в 1 г мозга. Нами принимался диаметр нейрона в среднем равным 20,0 мк. Поверхность всех нейронов (P) определялась следующим путем:

$$P = 4\pi r^2 n^2 = 4 \cdot 3,14 \cdot 10^2 \cdot 2,1 \cdot 10^7 = 2,64 \cdot 10^{10}, \text{ т. е. } 264 \text{ см}^2,$$

где  $r$  — радиус нейрона — 10 мк,

$n$  — число нейронов в 1 г больших полушарий —  $2,1 \cdot 10^7$ .

Если принять поверхность всех неронов в 1 г мозга крысы равной 264 см<sup>2</sup>, то для возникновения одного импульса во всех нервных клетках необходим перенос катионов в количестве  $6,0 \cdot 2 \cdot 10^{11} \cdot 264 = 1,6 \cdot 10^{14}$  ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>.

Зная количество катионов, необходимое для возникновения одного импульса во всех нейронах одновременно, мы можем определить, какое количество импульсов может быть обеспечено за счет переноса ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> с участием свободных анионных групп N-ацетилнейраминовой кислоты ганглиозидов. Нами было определено количество свободных анионных групп ганглиозидов в 1 г больших полушарий, оно равно примерно  $7,5 \cdot 10^{17}$ . Следовательно, число импульсов, которое может быть обеспечено ганглиозидами, будет равным примерно

$$\frac{7,5 \cdot 10^{17}}{1,6 \cdot 10^{14}} = 470 \text{ (41)}.$$

Если учесть, что не все нервные клетки мозга будут находиться в состоянии возбуждения, а продолжительность нервного импульса равняется десятым долям секунды, то становится очевидным, что анионные группы N-ацетилнейраминовых кислот ганглиозидов могут обеспечить транспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

На примере ганглиозидов видно, что нервная ткань потенциально располагает огромными резервами свободных анионных групп за счет N-ацетилнейраминовой кислоты ганглиозидов. Если к тому же учесть, что и другие пластические вещества (фосфолипиды и т. д.) могут принимать участие в переносе ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , то наличие свободных анионных групп значительно превосходит реальные потребности. Однако следует иметь в виду, что в расчетах мы исходили из теоретически возможных свободных анионных групп N-ацетилнейраминовой кислоты, содержащихся в ганглиозидах, в то время как в целостном организме далеко не все свободные анионные группы могут непосредственно участвовать в переносе ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

### Заключение

Из представленного экспериментального материала видно, что метод ТСХ в сочетании с изотопным или другим методом позволяет более детально изучить роль липидов головного мозга. Используя метод ТСХ и радиоактивной индикации ( $\text{C}^{14}$ ), можно представить последовательность синтеза свободных жирных кислот, моно-, ди- и триглицеридов и фосфолипидов за счет различных предшественников, как-то: ацетата-1- $\text{C}^{14}$ , ацетата-2- $\text{C}^{14}$ , глюкозы- $\text{C}^{14}$  и т. д.

Однако следует отметить, что разделение фосфолипидов на отдельные фракции методом ТСХ полностью нам не удалось, это прежде всего относится к фосфатидным кислотам и фосфоинозитидам.

Разделение ганглиозидов методом ТСХ в сочетании с применением радиоактивного углерода- $\text{C}^{14}$  позволило изучить не только гетерогенность их, но и установить различия в интенсивности обмена отдельных фракций ганглиозидов. На основании содержания ганглиозидов и литературных данных о строении их нам удалось провести расчеты и сделать вывод о том, что нейроны головного мозга потенциально располагают значительными резервами свободных анионных групп за счет N-ацетилнейраминовой кислоты ганглиозидов. Это обеспечивает оптимальные условия для непрерывного проведения нервных импульсов. В головном мозгу аналогичная картина наблюдается и в отношении активности многих ферментов, так, например, активность лактикодегидрогеназы в нормальных условиях реализуется в мозговой ткани примерно на 1,5—2,0% по сравнению с потенциальными возможностями этого фермента (47).



Наши данные позволяют также сделать вывод о том, что ганглиозиды мозга по своей интенсивности обмена близки к интенсивности обмена гликогена, являющегося преимущественно энергетическим веществом в головном мозгу. Этот вывод согласуется с высказанным положением Е. М. Крепса о том, что в настоящее время стирается грань между понятием «структурное» и «функциональное», когда дело идет о внутриклеточных отношениях (48). Следовательно, пластические вещества, непосредственно участвующие в осуществлении определенных функций, и энергетические, обеспечивающие функции необходимым количеством энергии, можно в равной мере отнести к активно обменивающим соединениям. Это является особенно характерным для мозговой ткани, так как здесь создаются оптимальные условия для нормального функционирования нервных клеток в целостном организме.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Шталь Э., Хроматография в тонких слоях, Изд. «Мир», 1965.
2. Ахрем А. А., Кузнецова А. Н., Тонкослойная хроматография, М., 1965.
3. Folch J., Ascoli L., Lees M., Meath J. A., Baron N., J. Biol. Chem., **191**, 833, 1951.
4. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G. H., J. Biol. Chem., **226**, 497, 1957.
5. Freeman C. P., West D., J. Lipid Res., **5**, 356, 1966.
6. Ayers J., Anal. Chem. Acta, **15**, 77, 1964.
7. Duncombe W. G., Biochem. J., **88**, 7, 1963.
8. Carlson L. A., J. Atheroscler. Res., **3**, 334, 1963.
9. Hofman A. E., J. Lipid Res., **3**, 391, 1962.
10. Krell K., Hashim S. A., J. Lipid Res., **4**, 407, 1963.
11. Skimode W. D., Enteman C., J. Lipid Res., **3**, 450, 1962.
12. Липская А. А., Сб.: Нервная система, № 6. Изд. ЛГУ, 1965.
13. Прохорова М. И., Беспалова М. А., Липская А. А., Романова Л. С., Туманова С. Ю., Флеров М. А., Проблемы нейрхимии. Изд. «Наука», Л., 1966.
14. Кеннеди Е. П., Труды V МБ.К. Симпозиум VII. Биосинтез липидов, М., 1962.
15. Kornberg A., Pricer W. E., J. Biol. Chem., **204**, 345, 1953.
16. Smith S. W., Weiss S. R., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., **228**, 915, 1957.
17. Hokin L. E., Hokin M. R., J. Biol. Chem., **234**, 1387, 1957.
18. Johnson G. A., McCluer R. H., Biochim. Biophys. Acta, **70**, 487, 1963.
19. Korey S., Gonatos J., Life Science, **5**, 296, 1963.
20. Svennerholm L., J. Neurochem., **10**, 613, 1963.
21. Svennerholm L., J. Lipid Res., **5**, 145, 1964.
22. Wherrett J. R., Cumings J. N., Biochem. J., **86**, 378, 1963.
23. Wolfe L., Lowden J., Canad. J. Biochem., **42**, 104, 1964.
24. Прохорова М. И., Сб.: Нервная система. Изд. ЛГУ, № 7, 1966.
25. Bogoch S., Bogoch E., Nature, **183**, 59, 1959.
26. McIlwain H., Biochem. J., **78**, 24, 1960.
27. McIlwain H., Chemical Exploration of the Brain, Elsevier, 1963.
28. McIlwain H., Balakrishnan S., Biochem. J., **79**, № 1, 1P, 1961.

29. McIlwain H., Woodman R. J., Cummins J. T., *Biochem. J.*, **81**, 79, 1961.
30. Kuhn R., Wiegant H., Egge H., *Angew. Chem.*, **73**, 580, 1961.
31. Järnefelt J., *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 104, 111, 1961.
32. Järnefelt J., *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 643, 654, 1962.
33. Burton R. M., Gibbons J. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 220, 1964.
34. Burton R., Horward R. E., Baer A., Balfour J. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 441, 1964.
35. Green J. R., Day M., Roberts M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **132**, 58, 1961.
36. Bogoch S., *Biochem. J.*, **68**, 319, 1958.
37. Gammack D., *Biochem. J.*, **88**, 373, 1963.
38. Klenk E., Gielen W., Hoppe-Seylers *Z. physiol.*, **326**, 158, 1961.
39. Туманова С. Ю., Сб.: Нервная система. Изд. ЛГУ, № 5, 1964.
40. Прохорова М. И., Пенева Т. И., Романова Л. С., Туманова С. Ю., *Укр. биохим. жур.*, **35**, № 5, 1965.
41. Прохорова М. И., Сб.: Нервная система. Изд. ЛГУ, № 8, 1967.
42. Wolfe L. S., *Canad. J. Biochem.*, **48**, 491, 1964.
43. Hodgkin A. L., Huxley A. F., *J. Physiol.*, **116**, 449; **117**, 500, 1952.
44. Hodgkin A. L., Keynes R. D., *J. Physiol.*, **128**, 28, 1955.
45. Keynes R. D., Lewis P. R., *J. Physiol.*, **114**, 151, 1951.
46. Коннели К., *Соврем. пробл. биофизики*. Изд. ИЛ т. 2, 1961.
47. Мак-Ильвейн Г., *Биохимия и центральная нервная система*, М., 1962.
48. Крепс Е. М., Сб.: Функциональная эволюция нервной системы. Изд. «Наука», 1965.

# **КАЧЕСТВЕННАЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОЛИПИДОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И ИЗМЕНЕНИЯ АРТЕРИО-ВЕНОЗНОЙ РАЗНИЦЫ В ИХ СОДЕРЖАНИИ, А ТАКЖЕ В СКОРОСТИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ У СОБАК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРОКОЖНОГО РАЗДРАЖЕНИЯ**

**К. Г. Карагезян**

Институт биохимии АН Арм. ССР, Ереван

За последнее время с внедрением в биохимическую практику сравнительного и изотопного методов исследования создались новые возможности изучения функциональной роли липидов, в частности — фосфолипидов нервной системы. Было показано, что последние, составляя основную массу липидов головного мозга, относятся к категории функционально активных веществ, проявляющих различную степень обмениваемости в зависимости от их принадлежности к тем или иным представителям фосфолипидов, а также локализации в функционально различных отделах центральной и периферической нервной системы. Эта точка зрения еще более подкреплена результатами исследований Абуда (1), Гейгера (2), Де-Роппа (3), Кнауффа и Бёкка (4) и др., показавших функциональную роль фосфолипидов в обмене веществ головного мозга как дополнительных источников энергии, а также указаниями последних лет относительно важной функциональной роли отдельных фосфолипидов в свертывании крови как активаторов и парализаторов этого процесса (5—11). Эти исследования основательно поколебали неверные представления о функциональной инертности фосфолипидов, в частности в нервной ткани, и наметили конкретные пути к изучению их функций в метаболизме различных органов и систем человека и животных.

Наши прежние исследования показали, что при функциональных состояниях, разыгрывающихся под действием электрокожного раздражения, наступает значительное увеличение содержания фосфора общих фосфолипидов в крови, оттекающей



от мозга (12, 13). Для этих исследований перед нами была поставлена задача выяснить, за счет каких индивидуальных фракций фосфолипидов происходит возрастание уровня суммарного липидного фосфора в крови, оттекающей от мозга, а также проследить за колебаниями в скорости мозгового кровообращения, которые нередко могут оказаться причиной возникновения указанных изменений.

### Методика

Исследования проводили на четырех собаках-самцах приблизительно одинакового веса, масти и режима содержания методом артерио-венозной разницы (14). Кровь для исследования брали как из общей сонной артерии, так и наружной яремной вены (из последней с 14—18-секундным запаздыванием согласно времени полного кровообращения в мозгу, 15). Определение содержания фосфолипидов производили методом Маринетти и Штотца (16) в модификации Смирнова и сотр. (17) и с некоторыми нашими видоизменениями. Материалом для экстракции служил ацетоновый порошок, полученный из цельной крови в результате многократной (3—4 раза) обработки двух мл свежей крови 5 мл ацетона с последующим выпариванием полученной массы под током холодного воздуха с помощью аппарата ФЭН до образования сухого остатка, который тщательно растирали в ступке в тонкий порошок светлокорицевого цвета. Экстракцию липидов вначале производили пятикратно этанол-хлороформной смесью (1:2) на холоду, в первый раз с использованием 2 мл, а в последующие разы — 1,5 мл экстрагента. Этим способом достигалось почти полное извлечение фосфолипидов из исследуемого материала. В дальнейшем кровавый порошок еще трижды обрабатывали 1 мл той же этанол-хлороформной смеси в водяной бане при 60°С в течение 2—3 минут при тщательном перемешивании. Получаемый экстракт приливали к основному. Разработанная таким образом методика позволяет добиться максимального извлечения фосфолипидов из кровавого порошка. При сравнении результатов экстракции фосфолипидов из свежей цельной крови собаки и кровавого порошка, мы пришли к заключению, что в последнем случае они извлекаются значительно полнее, так как при получении порошка происходит выпадение всех белков крови, которые в первом случае частично переходят в экстракт, загрязняя его и осложняя последующие процедуры. Другим преимуществом работы с обезвоженным материалом является то, что при этом не происходит разбавления и нарушения необходимого соотношения между компонентами экстрагирующей смеси, что является важным условием в работе с липидами.

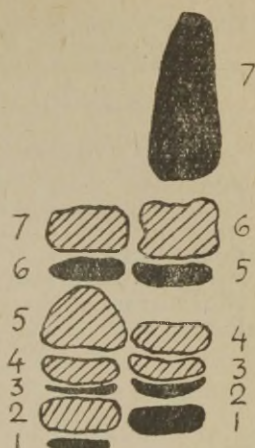
Фосфолипидные фракции получали методом распределительной восходящей хроматографии на бумаге (Filtrak FN-II), пропитанной кремневой кислотой, в специально смонтированной термостатной комнате при 23°С в течение 24—30 часов.

### Результаты исследований

Как вытекает из рисунка 1, фосфолипиды цельной крови вышеописанным методом подразделяются на семь отдельных фракций в следующей последовательности от линии старта: 1) неидентифицированный фосфолипид, 2) лизолецитины, 3) монофосфоинозит-фосфатиды, 4) сфингомиэлины, 5) лецитины; 6) серин-фосфатиды, 7) этаноламин-фосфатиды. Следует отметить, что для отчетливого разделения фосфолипидов необходимо

Рис. 1. Хроматограмма индивидуальных фосфолипидов.

- Цельная кровь (слева)  
 1) Неидентифицированный фосфолипид  
 2) лизолецитины  
 3) монофосфоинозит-фосфатиды  
 4) сфингомиелины  
 5) лецитины  
 6) серин-фосфатиды  
 7) этаноламин-фосфатиды  
 Мозг (справа)  
 1) Дифосфоинозит-фосфатиды  
 2) монофосфоинозит-фосфатиды  
 3) сфингомиелины  
 4) лецитины  
 5) серин-фосфатиды  
 6) этаноламин-фосфатиды  
 7) полиглицерофосфатиды



наносить на хроматографическую бумагу такое количество экстракта, которое содержало бы не более 6—8 мкг липидного фосфора. Для этого экстракт от 2 мл крови мы доводили под вакуумом до объема 1 мл и из этого количества наносили на бумагу 0,06 мл.

В начале наших исследований не представлялось возможным идентифицировать индивидуальные фосфолипиды с помощью чистых свидетелей из-за отсутствия их, и мы в основном руководствовались результатами исследований Маринетти и Смирнова. Указанные авторы применили с целью идентификации фосфолипидов как чистые свидетели их, так и многочисленные химические тесты, позволившие сделать окончательный вывод относительно качественного и количественного состава фосфолипидов сердечной мышцы и мозга. При этом мы нашли хорошее совпадение наших данных с вышеописанными. В дальнейшем, с получением чистых фосфолипидных свидетелей лецитина, этаноламин-фосфатида, серин-фосфатида, сфингомиелина и инозитол-фосфатида, производства Sigma Chemical Company, нам удалось окончательно убедиться в правильности качественной характеристики отдельных представителей фосфолипидов цельной крови, сделанной путем сравнения полученных нами данных с литературными. Что же касается лизолецитинов, то наблюдаемая нами картина расположения соответствующего им пятна на хроматограмме хорошо согласуется с результатами исследований Этьена и Полоновского (18).

Согласно нашим наблюдениям, количество фосфолипидного фосфора цельной крови собаки, определенного по Фиске и Суббароу (19), составляет 8—11 мг% и хорошо согласуется с данными литературы (20). В таблице 1 показано процентное содержание фосфора каждого фосфолипида в отдельности из об-



Таблица 1

Количественное содержание фосфора отдельных фосфолипидов цельной крови собак в мкг/мл и % от суммарного фосфора всех фракций в норме

Фосфолипиды	Р в мкг/мл	% от суммы Р
Кефалины	7,48	8,05
Серинфосфатиды	3,76	4,04
Лецитины	57,80	62,08
Сфингомиелины	14,60	15,68
Монофосфоинозитидфосфатиды	2,70	2,90
Лизолецитины	5,34	5,73
Неидентифиц. фосфолипиды	1,42	1,52
Сумма	93,10 (9,31 мг%)	100%

щего содержания фосфолипидного фосфора в мкг/мл свежей цельной крови. При этом бросается в глаза подавляющее количество фосфора лецитинов, затем сфингомиелинов, кефалинов, лизолецитинов, серин-фосфатидов, монофосфоинозит-фосфатидов и неидентифицированного фосфолипида пятна 1.

Наши исследования показали, что в нормальных условиях имеет место незначительное (статистически не достоверное) превалирование фосфолипидного фосфора в крови, оттекающей от мозга. После получения стойкого контрольного фона артериовенозной картины в содержании общих и индивидуальных фосфолипидов цельной крови, мы приступили к изучению действия электрокожного раздражения на количественные сдвиги индивидуальных фосфолипидов в крови, питающей мозг и оттекающей от него до опыта и через 5 и 20 минут после раздражения. Электрокожное раздражение напряжением в 30—40 вольт в течение 20—30 секунд наносили на очищенную поверхность кожи нижней трети задней конечности.

Результаты наших исследований показали, что, как и прежде, электрокожное раздражение вызывает чувствительное увеличение уровня липидного фосфора в крови, оттекающей от мозга. Как видно из рисунка 2, это увеличение обусловлено главным образом количественным возрастанием содержания изученных нами нейтральных фосфолипидов: лецитинов, этаноламин-фосфатидов, сфингомиеланов и лизолецитинов. Что касается кислых фосфатидов: серин-фосфатидов, монофосфоинозит-фосфатидов и неидентифицированного фосфолипида, то их количество, наоборот, значительно убывает в крови, оттекающей от мозга, особенно через 20 минут после действия электрокожного раздражения. Так как степень увеличения содержания нейтральных фосфолипидов намного превалирует над уменьшением уровня кислых фосфатидов в крови, оттекающей от мозга,



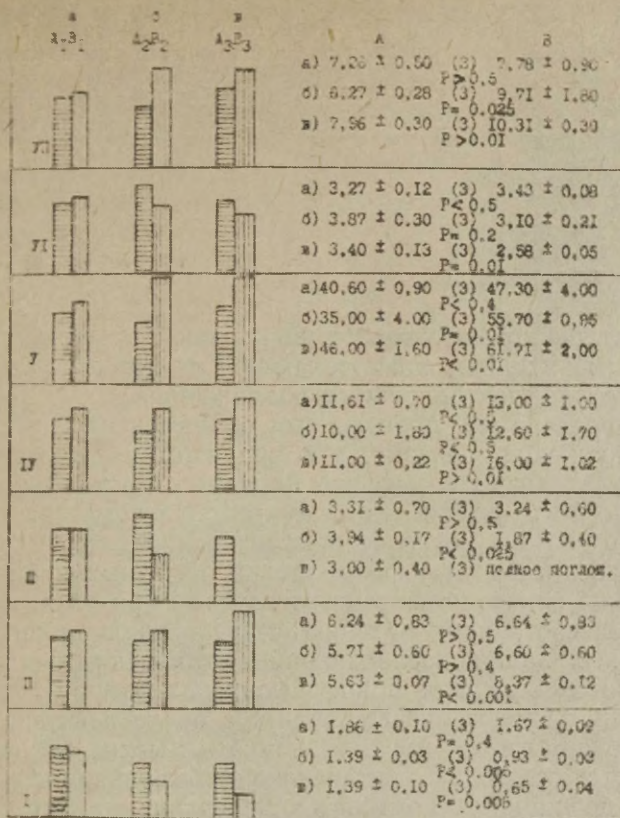


Рис. 2. Количественные изменения фосфора индивидуальных фосфолипидов:

I) неидентифицированный фосфолипид, II) лизолецитины, III) монофосфоинозит-фосфатиды, IV) сфингомиэлины, V) лецитины, VI) серин-фосфатиды, VII) этаноламин-фосфатиды цельной крови (артерио-венозная разница: А — общая сонная артерия, В — наружная яремная вена) в мкг/мл до опыта (а), через 5 (б) и 20 (в) минут после электрокожного раздражения.

баланс липидного фосфора в ней при функциональных состояниях, разыгрывающихся в условиях действия электрокожного раздражения, заметно возрастает как по сравнению с исходными показателями, так и с уровнем их в крови, питающей мозг.

Интересно отметить, что электрокожное раздражение вызвало не только чувствительное уменьшение содержания кислых фосфолипидов, в том числе и монофосфоинозит-фосфатидов, в крови, оттекающей от мозга, но и полное исчезновение последних в ней, что носило в подавляющем большинстве случаев закономерный характер. Как видно из рисунка 3, фосфолипидное пятно, соответствующее монофосфоинозит-фосфатидам,



Рис. 3. Хроматограмма индивидуальных фосфолипидов цельной крови до опыта (слева) и через 20 минут после действия электрокожного раздражения (справа); здесь отсутствует третье пятно, принадлежащее монофосфоинозит-фосфатам.

отсутствует на хроматограмме, полученной от разделения фосфолипидов цельной крови, оттекающей от мозга через 20 минут после действия электрокожного раздражения.

Ряд исследований, проведенных с применением электрокожного раздражения, показал, что при этом имеет место интенсификация включения меченого фосфата в фосфолипиды (21—27). Кроме того, за последнее время в литературе появилось все больше указаний относительно исключительно высокой реактивности инозитовых фосфолипидов в обменных процессах, что было хорошо показано изотопным методом при различных функциональных состояниях организма. На основании приведенных выше данных наших исследований в отношении значительного уменьшения содержания монофосфоинозит-фосфатидов в крови, оттекающей от мозга через 20 минут после действия электрокожного раздражения, мы склоняемся к мысли, что эти липиды подвергаются не только интенсивной обмениваемости при том или ином функциональном состоянии организма, что свидетельствует о важности их функционального значения в обменных процессах, но и чувствительным количественным колебаниям, которые указывают на активно протекающий синтез и распад этих веществ при указанных состояниях.

Как указывалось выше, в наших исследованиях отмечалось чувствительное уменьшение и количества неидентифицированного фосфолипида, снятого с пятна 1. Заслуживает внимания тот факт, что уже после однократного электростимулирования у подопытных собак наблюдалось четкое условнорефлекторное понижение исходного уровня указанного липида после помещения животного в экспериментальную комнату (обстановочный рефлекс). Как видно из таблицы 2, в первый день электрокожное раздражение вызвало заметное понижение уровня неидентифицированного фосфолипида как в крови, питающей мозг, так и в оттекающей от него, хотя не наблюдалось заметных изменений в артерио-венозной разнице содержания этого липида, составлявшее всего 0,15 мкг/мл ( $0,65 - 0,50 = 0,15$  мкг/мл). Во второй день отмечалось значительное понижение уже исходного уровня фосфора указанного липида и в крови, питающей мозг, и в крови, оттекающей от него, по срав-



Таблица 2

Динамика развития артерио-венозной разницы в содержании фосфора неидентифицированных фосфолипидов в мкг/мл в процессе электрокожного (болевого) раздражения

Пробы крови	1-й день		2-й день		3-й день	
	Артерия	Вена	Артерия	Вена	Артерия	Вена
До раздражения	1,86	1,67	0,50	0,65	0,78	0,78
Через 5 мин после раздражения	0,67	0,23	0,65	0,10	0,36	0,10
Через 20 мин после раздражения	0,59	0,67	0,78	0,78	0,87	0,12

нению с показателями первого опытного дня. Как видно из приведенной таблицы, уровень фосфора неидентифицированного фосфолипида в условиях экспериментальной обстановки упал в исходной пробе крови, питающей мозг, с 1,86 мкг/мл до 0,67 мкг/мл, а в крови, оттекающей от мозга, — с 1,67 мкг/мл до 0,23 мкг/мл. Артерио-венозная разница его содержания при этом в исходной пробе составляла 0,44 мкг/мл ( $0,67 - 0,23 = 0,44$  мкг/мл). Эта разница еще более возросла через 5 минут после действия электрокожного раздражения, составляя 55 мкг/мл. Несмотря на то, что в абсолютном выражении артерио-венозная разница содержания фосфора неидентифицированного фосфолипида при втором действии электрокожного раздражения более чем вдвое превышала таковую через 20 минут, тем не менее нельзя считать, что в последнем случае имеет место ослабление проявляемого эффекта, так как при этом и без того мы обнаружили максимальное снижение уровня неидентифицированного фосфолипида в обеих системах крови (0,36 мкг/мл фосфора в артериальной крови и 0,10 мкг/мл в венозной. На третий день исходный уровень фосфора неидентифицированного фосфолипида как в артериальной крови, так и в венозной оставался низким, а через 20 минут после электрокожного раздражения еще более понизился. Артерио-венозная разница при этом составляла 0,75 мкг/мл ( $0,87 - 0,12 = 0,75$  мкг/мл). Эти данные свидетельствуют об условнорефлекторном изменении содержания отдельных фосфолипидов крови и подтверждают ранее полученные нами факты относительно количественных сдвигов фосфора суммарных фосфолипидов при безусловно- и условнооборонительном рефлексам.

Накопленный нами фактический материал позволяет сделать вывод о том, что количественные колебания отдельных фосфолипидных фракций в крови, питающей мозг и оттекающей от него, при функциональных состояниях, разыгрывающихся в



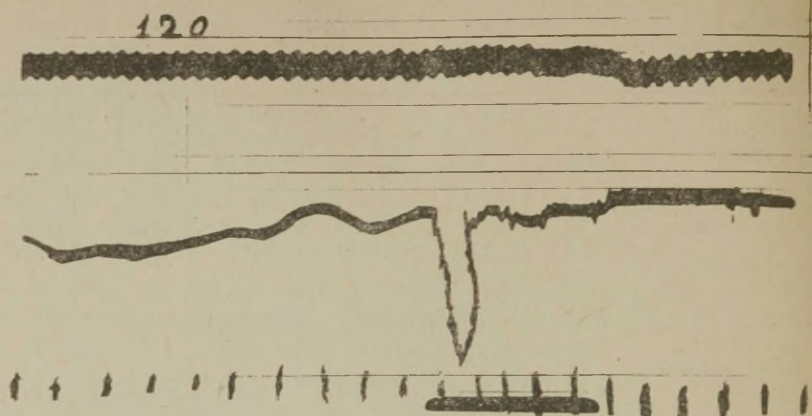


Рис. 4. Электрометрическое определение объемной скорости мозгового кровотока в условиях действия электрокожного раздражения: кривые сверху вниз — артериальное давление, скорость мозгового кровотока (по изменениям скорости кровотока в системе общей сонной артерии), отметчик времени в 10", отметчик момента нанесения электрокожного раздражения.

условиях действия электрокожного раздражения, являются следствием соответствующих изменений в обмене веществ самого головного мозга, который, видимо, в зависимости от характера функционального состояния выделяет в периферический кровоток одни фосфолипиды и, наоборот, поглощает из него другие. Однако известно, что в некоторых случаях подобные сдвиги могут возникнуть в результате изменений, наступающих в скорости мозгового кровообращения. Учитывая это, мы решили провести серию исследований по изучению колебаний мозгового кровотока в момент действия электрокожного раздражения и последействия. Как показывает рисунок 4, электрокожное раздражение в использованной дозировке вызывает кратковременное, но резкое замедление скорости мозгового кровотока, которое вскоре, в течение не более чем одной минуты восстанавливается, достигая первоначального уровня. Как видно из приведенного рисунка, такой фон мозгового кровообращения сохранялся довольно стабильно и сопровождал все описанные выше колебания в содержании изученных фосфолипидных фракций на протяжении всего опыта. Таким образом не вызывает сомнений, что изученные нами изменения уровня фосфора индивидуальных фосфолипидов цельной крови, притекающей в мозг и оттекающей из него, при функциональных состояниях, сопровождающих электрокожное раздражение, являются специфическими и имеют, быть может, прямое отношение к обмену веществ нервной ткани при данном функциональном состоянии.

За последние годы многочисленные литературные источники

указывают на важную функциональную роль фосфолипидов, особенно некоторых из них, в мозговом метаболизме. Эти исследования, проведенные в основном с помощью сравнительного и изотопного методов, позволяют говорить о несостоятельности ранее существовавшего мнения относительно функциональной индифферентности фосфолипидов в деятельности нервной системы вообще и ее высших отделов, в частности. Наши исследования показали, что функциональная роль фосфолипидов, по всей вероятности, не исчерпывается их активной обменяемостью при различных функциональных состояниях ЦНС, как это показано отечественными и зарубежными авторами, а некоторые из них, как, например, монофосфоинозит-фосфатиды, подвергаются также исключительно выраженным количественным превращениям, что может свидетельствовать об их деятельном участии в различных биохимических реакциях нервной ткани и других органов, и прежде всего — в процессах энергетического обмена. Эти исследования проливают свет на дальнейшее изучение функциональной роли отдельных представителей фосфолипидов в обмене веществ нервной ткани, крови и других органов и систем организма.

### Выводы

1. В нормальных условиях отмечается незначительное (статистически недостоверное) выделение фосфолипидов мозгом в периферический кровоток.

2. Содержание липидного фосфора в цельной крови собаки колеблется в пределах 8—11 мг%.

3. Качественный и количественный состав фосфолипидов цельной крови следующий: 1) неидентифицированный фосфолипид — 1,52%; 2) лизолецитины — 5,73%; 3) монофосфоинозит-фосфатиды — 2,9%; 4) сфингомиелины — 15,68%; 5) лецитины — 62,08%; 6) серин-фосфатиды — 4,04%; 7) этаноламин-фосфатиды — 8,05%.

4. Электрокожное раздражение вызывает чувствительное возрастание артерио-венозной разницы в содержании фосфора суммарных фосфолипидов за счет значительного увеличения количества нейтральных фосфолипидов в крови, оттекающей от мозга.

5. Уровень кислых фосфатидов, наоборот, понижается в крови, оттекающей от мозга через 20 минут после электрокожного раздражения, а в подавляющем большинстве случаев отмечается полное исчезновение монофосфоинозит-фосфатидов в указанной крови.

6. Количество неидентифицированного фосфолипида подвергается выраженным условнорефлекторным изменениям (обстановочный рефлекс) с возрастанием артерио-венозной разницы в его содержании.

7. Электрокожное раздражение в использованной дозировке вызывает кратковременное (10—15 секунд), но резкое замедление скорости мозгового кровообращения, которое приблизительно в течение одной минуты нормализуется, возвращаясь к исходному уровню.

8. Описанные изменения артерио-венозной разницы в содержании изученных нами суммарных и индивидуальных фосфолипидов цельной крови, питающей мозг и оттекающей от него, при функциональных состояниях, разыгрывающихся в условиях действия электрокожного раздражения через 5 и 20 минут, являются не следствием изменений, развивающихся в скорости мозгового кровотока, а имеют отношение к специфическим сдвигам в обмене веществ головного мозга при указанных состояниях.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Abood L. G., Geiger A., *Am. J. Physiol.*, **182**, 557, 1955.
2. Geiger A., *Physiol. Rev.*, **38**, I, 17, 1958.
3. De Ropp R. S., Snedeker E. H., *J. Neurochem.*, **7**, 128, 1961.
4. Knauff H. G., Böck F., *J. Neurochem.*, **6**, 171, 1961.
5. Turner D. L., Silver M. J., Tocantins L. M., *Arch. Biochim. Biophys.*, **77**, 249, 1958.
6. Silver M. J., Turner D. L., Tocantins L. M., *J. Physiol.*, **190**, 8, 1957.
7. Marcus A. J., Spaet T. H., *J. Clin. Invest.*, **37**, 1836, 1958.
8. Gobbi F., Stefanini M., *Fed. Proc.*, **17**, 438, 1958.
9. Therriault D. G., Nichols T., *Fed. Proc.*, **17**, 322, 1958.
10. Rouser G., White S. D., Schlorodt D., *Fed. Proc.*, **16**, 322, 1957.
11. Lilly E., *Research Today*, **15**, 2, 23, 1959.
12. Карагезян К. Г., в кн. III Всесоюз. конф. по биохим. нервн. сист., (сб. докл.), изд. АН АрмССР, Ереван, 1963.
13. Karageosian C. G., *Sixth Int. Congress Biochemistry, Abstracts VII. Lipids and Steroids*, N. Y., 580, 1964.
14. Кедров А. А., Науменко А. И., Дегтярева З. Я., *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, **9**, 10, 1954.
15. Егян В. Б., *Изв. АН Арм. ССР (биол. науки)*, **13**, 43, 1960.
16. Marinetti C. V., Stotz E., *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 168, 1956.
17. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., *Биохимия*, **26**, 6, 1027, 1961.
18. Etienne J., Polonovski J., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 857, 1960.
19. Fiske C. H., Subbarow J., *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
20. Асатиани В. С., *Биохимический анализ*, ч. III, изд. Грузмедгиза, Тбилиси, 1953.
21. Владимиров Г. Е., *Физиол. ж. СССР*, **39**, 3, 1953.
22. Владимиров Г. Е., в кн.: *Функциональная биохимия мозга*, изд. АН СССР, 1954.
23. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Правдина Н. И., *Биохимия*, **19**, 578, 1954.
24. Палладин А. В., *Ж. высшей нервной деятельности*, **6**, 1954.
25. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Рубель Л. Н., *Тр. Ин-та физиологии им. И. П. Павлова*, **V**, 409, 1956.
26. Владимиров Г. Е., в кн.: *Вопросы биохимии нервной системы*, изд. АН УССР, Киев, 247, 1957.
27. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Правдина Н. И., *Биохимия*, **22**, 1—2, 351, 1957.



## О ЛИПИДНОМ КОМПОНЕНТЕ ПРОТЕОЛИПИДОВ МОЗГА

К. Г. Манукян

Институт биохимии АН Арм. ССР, Ереван

В настоящее время известно, что большинство липидов и белков в нервной ткани находятся не в свободном состоянии, а связаны друг с другом, образуя липопротеидные комплексы. Именно липидно-белковым комплексам придается большое значение при изучении функционального обмена липидов и, в частности, их участия в явлениях проницаемости, а следовательно, и в явлениях возбудимости и проводимости.

Одними из характерных для нервной ткани липопротеидов являются протеолипиды, выделенные впервые Фольчем и Лис в 1951 г. (1) из белого вещества мозга. В отличие от большинства других липопротеидов, которые растворимы в воде или растворах солей, протеолипиды представляют белково-липидные комплексы, растворимые в органических растворителях, чем и обусловлено их название.

Протеолипиды — совершенно определенные комплексы, присутствующие в тканях в постоянных количествах. Они широко распространены, но особенно богаты ими белое вещество мозга, где протеолипидный белок составляет 2,0—2,5% от веса влажной ткани (1, 2).

За последние годы накоплен ряд данных о составе, строении и локализации протеолипидов в нервной системе (2—4). Они касаются в основном белкового компонента этих комплексов. Липидный и, в частности, фосфатидный состав протеолипидов изучен пока недостаточно, и все имеющиеся данные относятся только к белому веществу мозга.

О липидном компоненте протеолипидов известно следующее. Липиды составляют около  $\frac{1}{3}$  от веса очищенных протеолипидов, выделенных из белого вещества мозга методом эмульгирования-центрифугирования. Они представлены в основном фосфолипидами: серинфосфатид — более 50% всех фосфатидов, связан-

ных с протеолипидами, инозитфосфатиды — около 30%, этаноламинфосфатид, присутствующий в варьирующих количествах от 17 до 27%, сфингомиелин от 7 до 14%, лецитин и плазмалогены — следы. С протеолипидами связаны также гликолипиды (видимо, цереброзиды) и в небольшом количестве холестерин (2, 5, 6).

Часть фосфатидов связана с белком протеолипидов более прочной связью, которая не разрушается даже в таких условиях (действие трикалийцитрата и т. д.), когда большинство других, менее прочно связанных фосфолипидов теряет связь с белком (6, 7). Эти прочно связанные фосфатиды извлекаются только подкисленными растворителями и являются в основном ди- и трифосфоинозотидами (4, 6, 8, 9). Они присутствуют в протеолипидах в виде фосфатидопептидов (10). Фосфор прочно связанных липидов составляет примерно 60 мкг/г влажной ткани и отличается высоким обменом, близким к обмену Р других инозитсодержащих фосфатидов (8).

Содержание остальных фосфатидов и, в частности, серинфосфатида, а также гликолипидов и холестерина в протеолипидах может сильно варьировать в зависимости от условий выделения (11).

Накоплены факты, дающие основание предположить, что различные протеолипиды отличаются не по белковому компоненту, который идентичен, а по типу и количеству прочно связанных фосфатидов (2). Таким образом исследование липидного и особенно фосфатидного компонента протеолипидов имеет большое значение для характеристики этих комплексов.

Задача настоящей работы — выделить протеолипиды из серого и белого вещества мозга (из небольших навесок ткани) и изучить качественный и количественный состав связанных с ними фосфолипидов.

#### Методика

Исследовалось серое (кора больших полушарий) и белое (область *corp. callosum* и *corona radiata*) вещество мозга крупного рогатого скота и кошек.

Липиды экстрагировали из мозговой ткани 20-кратным объемом смеси хлороформ-метанол (2:1) и отмывали для удаления нелипидных примесей 0,2 объемами воды по методу Фольча и др. (12). К промытой нижней хлороформной фазе добавлялась еще половина имеющегося объема хлороформа, чтобы полностью предупредить образование двух фаз и денатурацию протеолипидов во время выпаривания, после чего растворители удалялись вакуумной дистилляцией при 30—40° С. Высушенные пробы эмульгировали в 33-кратном объеме воды и выделяли протеолипиды методом эмульгирования-центрифугирования (5, 13).

Полученные препараты протеолипидов лиофилизировали, осадки промывали для удаления примесей свободных липидов 2 раза семидесятикратным объемом этилового эфира и 2 раза восьмидесятикратным объемом этилового спирта. Очищенные протеолипиды растворяли в смеси хлороформа с метанолом, почти насыщенной водой (хлороформ-метанол-Н<sub>2</sub>O — 2:1:0,2

или хлороформ-метанол-Н<sub>2</sub>O — 80 : 22 : 3; последняя в наших условиях давала как будто лучшее растворение). Определяли поглощение растворов при длине волны 280 мкм, затем их упаривали (при 40°С) для разрыва связи между липидами и белками. К осадкам еще дважды добавляли влажную смесь хлороформа с метанолом (2 : 1) и каждый раз упаривали досуха для возможно более полного отщепления липидов. Высушенные осадки экстрагировали 2 раза простой смесью хлороформ-метанола 2 : 1 (заливали каждый раз кипящей смесью и оставляли на 3 часа при комнатной температуре) и 2 раза подкисленной смесью (хлороформ-метанол-12N HCl — 200 : 100 : 1) для извлечения более прочно связанных фосфолипидов (пробы заливались смесью и оставлялись на ночь в холодильнике, затем еще раз экстрагировались той же смесью 1 час при комнатной температуре). Остающийся после этого в белковом остатке фосфор составлял только 3—5% от общего фосфора протеолипидов.

Подкисленные экстракты промывали для удаления кислоты 0,2 объемами 0,05% CaCl<sub>2</sub>. Применяли CaCl<sub>2</sub>, так как известно, что кальциевые соли инозитфосфатидов менее растворимы. Однако как при промывании водой, так и 0,73% NaCl и 0,05% CaCl<sub>2</sub>, около 8—10 мкг Р/г влажной ткани в белом веществе мозга (т. е. примерно 5% от общего Р протеолипидов) и 0,6 мкг в сером (2,5—3,0% от общего Р) переходило в верхнюю водно-метаноловую фазу.

Для разделения фосфолипидов в полученных нейтральных и подкисленных экстрактах применяли метод хроматографии на бумаге, пропитанной кремневой кислотой, в модификации Смирнова, Чирковской и Манукян (14). Хроматографическое разделение производили в течение 22—24 часов при 23°С. Растворителем служила смесь дибутилового эфира-уксусной кислоты (ледяная)-хлороформа-воды (80 : 70 : 12 : 10,5).

## Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 1 приведены некоторые данные о протеолипидах, выделенных из серого и белого вещества мозга быка и кошки. Выход протеолипидов из белого вещества мозга быка равнялся 23,9 мг/г влажной ткани, что совпадает с данными Фольча — 25,6 мг/г (2, 5), у кошки был несколько ниже — 18,1 мг/г. Из серого от 2,8 до 2,3 мг/г, т. е. примерно в 8 раз ниже, чем из белого. Процент Р в протеолипидах серого вещества был несколько выше, чем белого.

Полученное нами для протеолипидов белого вещества мозга процентное содержание фосфора ниже величин, приводимых

Таблица 1

Некоторые данные о протеолипидах, выделенных из серого и белого вещества мозга

	Серое вещ-во больших полушарий		Белое вещ-во больших полушарий	
	Бык	Кошка	Бык	Кошка
Протеолипиды в мг/г влажного веса	2,8	2,3	23,9	18,1
Р (в % от веса протеолипидов)	0,8	0,9	0,7	0,8
E <sub>1 см</sub> <sup>1%</sup> 280 мкм	—	—	13,0	13,2



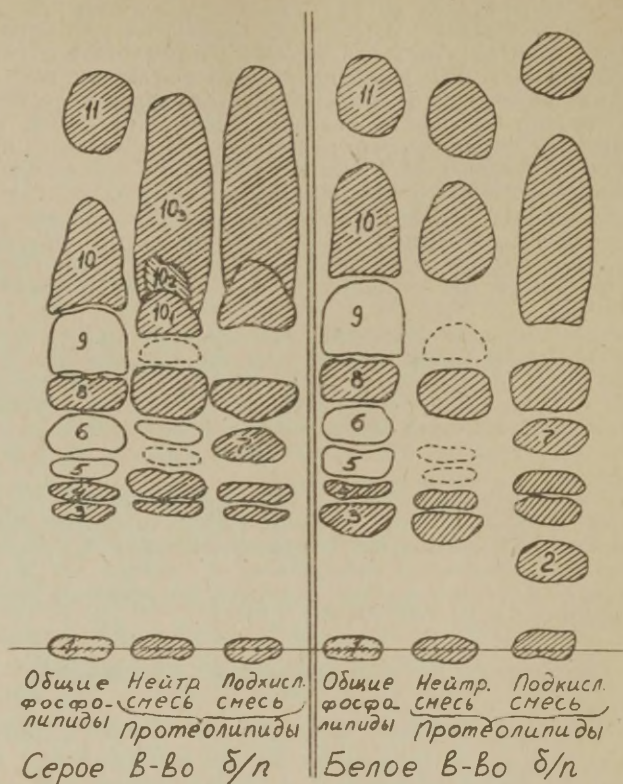


Рис. 1. Хроматограммы общих фосфолипидных экстрактов и фосфолипидов, выделенных нейтральной и подкисленной смесью из протеолипидов белого и серого вещества мозга крупного рогатого скота. Заштрихованы пятна фосфатидов, окрашивающихся роданином 6Ж в лиловый цвет, белые — пятна фосфатидов, окрашивающихся роданином 6Ж в желтый цвет.

1 — точки нанесения; 2 — неидентифицированный; 3 — дифосфоинозитид; 4 — монофосфоинозитид; 5 — сфингомиелин; 6 — лецитин; 7 — неидентифицированный; 8 — серинфосфатид; 9 — этаноламин-фосфатид; 10 — полиглицерофосфатиды; 11 — фосфатидная кислота.

Фольчем (0,97—1,22). Соответственно поглощение при длине волны 280 мкм, обусловленное высоким содержанием триптофана в белках протеолипидов, у наших препаратов значительно выше, чем у препаратов Фольча (8,8—11,2) и приближается к поглощению наиболее очищенных протеолипидов, выделенных Лис, Карр и Фольчем с помощью длительного диализа (11).

На рис. 1 приведены для сравнения хроматограммы фосфолипидов общих липидных экстрактов и липидов, извлеченных

нейтральной и подкисленной смесью из протеолипидов серого и белого вещества мозга. Как можно видеть, с протеолипидами и серого, и белого вещества мозга связаны в основном кислые фосфолипиды: дифосфоинозитид, монофосфоинозитид, серинфосфатид, полиглицерофосфатиды и фосфатидная кислота.

На хроматограммах нейтральных экстрактов протеолипидов серого вещества мозга было обнаружено три различных пятна, соответствующих по положению полиглицерофосфатидам и отличающихся по содержанию фосфора; на хроматограммах подкисленных экстрактов — два пятна. В настоящее время установлено, что в тканях встречаются разные полиглицерофосфатиды, отличающиеся по длине цепи, составу жирных кислот, по скорости обновления и своему значению в обмене: фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол-кардиолипин и др. (15—17).

Кроме выявляющихся обычно на хроматограммах общих липидных экстрактов мозга пятен фосфатидов, на хроматограммах подкисленных экстрактов протеолипидов было обнаружено еще два пятна, содержащих фосфор и окрашивающихся родамином 6Ж в лиловый цвет, т. е. принадлежащих кислым фосфатидам — 2-е и 7-е пятна (рис. 1).

Второе пятно, имеющее низкий  $R_f$ , является, по-видимому, каким-то инозитфосфатидом, так как сходные пятна были получены нами при разделении экстрактов фосфатидопептидов, содержащих, как известно, почти исключительно фосфоинозитиды, и инозитфосфатида, выпускаемого фирмой «Сигма» (фракция I по Фольчу).

Некоторая часть фосфолипидов, выделенных из протеолипидов (8—14% Р от общей суммы в белом веществе и 3—4% — в сером), задерживалась на точках нанесения, которые на хроматограммах липидных экстрактов протеолипидов окрашивались родамином 6Ж в интенсивно лиловый цвет. Трудно сейчас сказать что-либо определенное о происхождении этого фосфора. С одной стороны, можно предположить, что он принадлежит какому-то фосфатиду, который не продвигается в данной хроматографической системе, например, высокополярному фосфолипиду-трифосфоинозитиду. В пользу этого говорит более высокое содержание фосфора, остающегося на линии старта, в протеолипидах белого вещества мозга. Кроме того, на хроматограммах фосфатидопептидов мы обнаруживали такие же интенсивно лиловые фосфорсодержащие пятна на месте нанесения. С другой стороны, несмотря на неоднократное выпаривание, нам не удавалось полностью разрушить связь между белками и липидами в протеолипидах, вследствие чего и белки частично переходили в липидный экстракт. Можно предположить, что между кремневой кислотой и оставшимися в экстракте протеолипидами возникает какой-то вид электростатической комбинации, вслед-



ствие чего часть липидов задерживается на месте нанесения, о чем свидетельствуют также данные Матсумого и Фольча (9).

Остальные фосфолипиды — сфингомиелин, лецитин, этаноламинфосфатид, окрашивающиеся родамином 6Ж в желтый цвет, присутствовали в варьирующих количествах и не всегда были обнаружены (поэтому на рис. 1 обозначены пунктиром). Они были найдены только в менее прочно связанной с белком протеолипидов фракции липидов, извлекаемой нейтральными растворителями. Из них только лецитин постоянно выявлялся на хроматограммах нейтральных экстрактов протеолипидов серого вещества мозга. В более прочно связанной с белком фракции, извлекаемой подкисленными растворителями, эти фосфатиды ни разу не были обнаружены.

В табл. 2 приведены данные по содержанию фосфолипидов общего липидного экстракта и фосфолипидов, связанных с протеолипидами (сумма извлекаемых нейтральной и подкисленной смесью), в сером и белом веществе мозга крупного рогатого скота и кошек.

Следует отметить, что около 13—20% фосфора липидов, выделенных из протеолипидов, не снималось при элюировании и задерживалось на бумаге, по-видимому, в связи с обсуждавшимся раньше образованием связи между кремневой кислотой и протеолипидами. Выход фосфора липидов с хроматограмм обычных липидных экстрактов был равен примерно 95%.

Как видно из таблицы, около 4,0—4,5% фосфора суммарных фосфолипидов общего липидного экстракта белого вещества больших полушарий и около 1,3—1,5% серого связано с белками протеолипидов.

Содержание фосфолипидов, связанных с протеолипидами, как и следовало ожидать, в белом веществе намного выше, чем в сером.

Основными, преобладающими фосфолипидами в протеолипидах как серого, так и белого вещества мозга являются серинфосфатид, полиглицерофосфатиды и инозитфосфатиды.

С протеолипидами белого вещества мозга связано около 8—12% инозитфосфатидов суммарного липидного экстракта, 9% всего серинфосфатида и 25% всех полиглицерофосфатидов. С протеолипидами серого вещества связано около 15—20% всех полиглицерофосфатидов и только 2,5—3,0% серинфосфатида и инозитфосфатидов.

Протеолипиды серого и белого вещества мозга отличаются по процентным соотношениям входящих в их состав фосфатидов. Это более наглядно видно на рис. 2. Столбики изображают процент каждого фосфатида от суммы всех фосфатидов, связанных с протеолипидами.

Протеолипиды серого вещества мозга характеризуются очень высоким процентным содержанием полиглицерофосфатидов

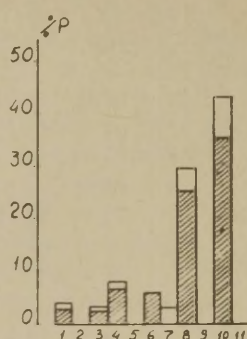
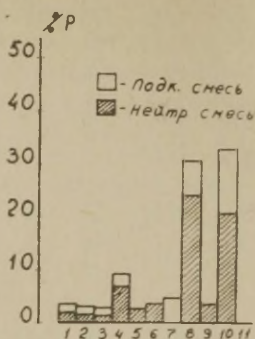


Таблица 2

Содержание отдельных фосфолипидов в общем липидном экстракте и протеолипидах серого и белого вещества больших полушарий (мкг Р/г влажного веса)

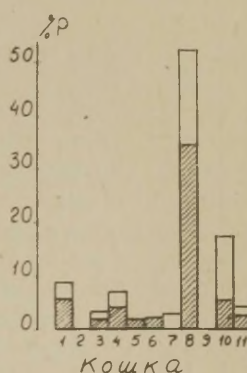
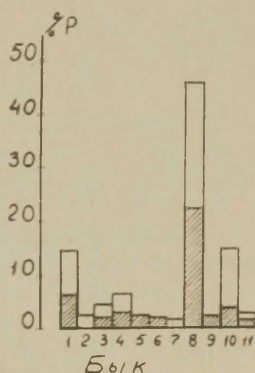
№ пят- на	Фосфолипиды	Протеолипиды				Общий липидный экстракт			
		Серое вещество		Белое вещество		Серое вещество		Белое вещество	
		Бык	Кошка	Бык	Кошка	Бык	Кошка	Бык	Кошка
1	Точки нанесения	0,67	0,69	20,31	9,33	27,80	13,89	85,65	44,68
2	Неидентифицированный	0,62	—	2,66	—	—	—	—	—
3	Дифосфоннозитид	0,57	0,56	6,10	3,29	21,42	12,81	48,90	43,38
4	Монофосфоннозитид	1,79	1,44	9,07	7,31	54,70	49,17	80,10	86,02
5	Сфингомиелин	0,56	—	2,87	1,76	150,60	138,40	712,03	560,70
6	Лецитин	0,75	1,05	2,85	2,00	543,77	593,49	894,74	900,29
7	Неидентифицированный	0,91	0,58	1,91	2,73	—	—	—	—
8	Серинфосфатид	5,92	5,14	64,64	56,09	212,26	212,06	694,92	632,89
9	Этаноламинфосфатид	0,72	—	3,22	—	341,75	357,36	778,44	842,75
10	Полиглицерофосфатиды	1 1,37	2,47	21,24	18,55	42,94	36,10	84,95	74,25
		2 0,55	0,78						
		3 4,56	4,21						
11	Фосфатидная кислота	—	—	4,09	4,50	—	10,05	—	45,05
Сумма		18,99	16,92	138,96	105,56	1395,24	1423,33	3379,73	3230,01

Серое Вещ-во Б/полушарий



Белое Вещ-во

Б/полушарий



Бык

Кошка

Рис. 2. Содержание отдельных фосфолипидов, извлекаемых нейтральной и подкисленной смесью из протеолипидов серого и белого вещества мозга (в % от общей суммы фосфолипидов, связанных с протеолипидами).

1 — точки нанесения; 2 — неидентифицированный; 3 — дифосфоинозитид; 4 — монофосфоинозитид; 5 — сфингомиелин; 6 — лецитин; 7 — неидентифицированный; 8 — серинфосфатид; 9 — этаноламинфосфатид; 10 — полиглицерофосфатиды; 11 — фосфатидная кислота.

(около 40%), которое здесь почти в 2,5 раза выше, чем в белом веществе, затем следует серинфосфатид (31%) и монофосфоинозитид (9%). В протеолипидах белого вещества в наибольшем количестве содержится серинфосфатид, составляющий примерно 50% всех фосфатидов, затем полиглицерофосфатиды (16—17%) и инозитфосфатиды (10—13%), а если принять, что на линии нанесения задерживается в основном какой-то инозитсодержащий фосфатид, то процент последних будет значительно выше (20—30%). Данные для мозга быка и кошки в общем очень сходны между собой.

На рис. 2 приведены также процентные соотношения фосфолипидов, извлекаемых нейтральной и подкисленной смесью. Заштрихованная часть столбика — процент фосфолипида, извлекаемого нейтральной смесью, от общей суммы фосфатидов, связанных с протеолипидами, белая — процент второй части того же фосфолипида, извлекаемой подкисленной смесью.

Из рис. 2 видно, что, как указывалось раньше, сфингомиелин, лецитин и этаноламинфосфатид связаны с протеолипидами менее прочной связью и целиком извлекаются при обработке нейтральными растворителями. Из кислых фосфатидов, окрашивающихся родамином 6Ж в лиловый цвет, большинство частично экстрагируется нейтральной смесью, частично подкисленной, т. е. часть одного и того же фосфатида связана с белком протеолипидов менее прочной связью, другая — более прочной. И лишь неидентифицированный фосфатид пятна 7 и в белом и в сером веществе мозга обнаруживается только в прочно связанной фракции, извлекаемой подкисленными растворителями.

В сером веществе мозга процент фосфатидов, менее прочно связанных с белками (70—80%), значительно выше, чем более прочно связанных (20—30%). В белом же веществе мозга количество фосфатидов, менее и более прочно связанных с белками, примерно одинаково.

При сравнении отдельных фосфатидов оказывается, что в сером веществе большая часть каждого из исследованных фосфолипидов (за исключением неидентифицированного фосфатида пятна 7) менее прочно связана с белком и извлекается нейтральными растворителями. В белом веществе мозга как быка, так и кошки наиболее прочно связаны с белком протеолипидов полиглицерофосфатиды, большая часть которых (около  $\frac{2}{3}$ ) извлекается только подкисленной смесью. В белом веществе мозга быка несколько выше также процент инозитфосфатидов, более прочно связанных с белком.

Как уже отмечалось, выделенные нами из белого вещества мозга протеолипиды отличались от полученных Фольчем несколько более низким процентным содержанием фосфора и более высоким поглощением при длине волны 280 мкм. По-видимому, это различие обусловлено меньшим содержанием в выделенных нами протеолипидах сфингомиелина, лецитина и особенно этаноламинфосфатида, процент которых часто сильно варьировал. Вероятно, эти фосфатиды связаны с белком протеолипидов слабой связью, которая может диссоциироваться в различной степени в зависимости от условий выделения.

Наши исследования показывают, что с протеолипидами нервной ткани связаны в основном в более постоянных количествах кислые фосфолипиды, фосфатные группы которых могут связываться электростатической связью с белками протеолипидов.



О наличии такой связи свидетельствует и присутствие в протеолипидах фракции, извлекаемой только подкисленными растворителями.

По данным Фольча, основными фосфатидами, наиболее прочно связанными с белком протеолипидов, являются полифосфоинозитиды, в частности — трифосфоинозитид.

Выделенная нами с помощью подкисленных растворителей фракция более прочно связанных с протеолипидами фосфолипидов белого вещества мозга тоже содержит инозитфосфатиды — моно- и дифосфоинозитиды (правда, применявшаяся методика не давала возможности определять трифосфоинозитид), но в ее состав входят также значительные количества серинфосфатида, который является преобладающим фосфатидом в обеих фракциях, извлеченных из белого вещества, и полиглицерофосфатидов, большая часть которых связана с белком прочной связью.

Полиглицерофосфатиды были обнаружены Мураками и др. (18) в протеолипидах сердечной мышцы (18%). Исходя из того, что в последней много кардиолипина, они предположили, что содержание значительных количеств этого фосфатида в протеолипидах специфично именно для сердца. Однако, по-видимому, связь полиглицерофосфатидов с протеолипидами носит более широкий характер. В сером веществе мозга они являются преобладающими фосфатидами протеолипидов, в белом — составляют 16—17% всех связанных с протеолипидами фосфолипидов.

Присутствие в протеолипидах наряду с инозитфосфатидами таких важных в метаболическом отношении фосфатидов, как полиглицерофосфатиды, представляет несомненный интерес. Эти специфически митохондриальные липиды связаны с окислительными ферментами, и особенно с цитохромоксидазой, в которой они являются основным фосфолипидным компонентом (19).

Наличие значительных количеств полиглицерофосфатидов в протеолипидах свидетельствует о том, что последние должны быть как-то связаны с митохондриями, так как полиглицерофосфатиды мозга, как и других органов, сосредоточены в основном в митохондриальной фракции (20, 21). И действительно, в опубликованных недавно исследованиях Мокраша показано, что протеолипиды мозга концентрируются в митохондриальной фракции (22). Сходные данные получены для сердечной мышцы (18).

В связи с обнаружением полиглицерофосфатидов в протеолипидах мозга интерес представляет затронуть еще один вопрос — о локализации этих комплексов в миелине. Поскольку полиглицерофосфатиды в миелине не найдены (23), можно думать, что протеолипиды, по крайней мере часть из них, не входят в состав периодически повторяющейся структурной единицы миелина, а являются компонентами каких-то других мембранных структур белого вещества мозга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Folch J., Lees M., J. Biol. Chem., **191**, 807, 1951.
2. Folch-Pi J., in: Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies, ed. by Folch-Pi J. and Bauer H., Amsterdam, Elsevier, **18**, 1963.
3. Манукян К. Г., в сб.: Вопросы биохимии мозга, изд. АН Арм. ССР, Ереван, **1**, 173, 1964.
4. Folch-Pi J., Feder. Proc., **23**, 630, 1964.
5. Folch-Pi J., Exposés Ann. Biochim. Med., **21**, 81, 1959.
6. Pritchard E. T., Folch-Pi J., Biochim. Biophys. Acta, **70**, 481, 1963.
7. Webster G. R., Folch J., Biochim. Biophys. Acta, **49**, 399, 1961.
8. Le Baron F. N., Hauser G., Ruiz E. E., Biochim. Biophys. Acta, **60**, 338, 1962.
9. Matsumoto M., Matsumoto R., Folch-Pi J., J. Neurochem., **11**, 829, 1964.
10. Le Baron F. N., in: Brain Lipids and Lipoproteins and the Leucodystrophies, ed. by Folch-Pi J. and Bauer H., Amsterdam, Elsevier **31**, 1963.
11. Lees M. B., Carr S., Folch J., Biochim. Biophys. Acta, **84**, 464, 1964.
12. Folch J., Less, M., Sloane-Stanley G. H., J. Biol. Chem., **226**, 497, 1957.
13. Folch J., Webster G. R., Lees M., Feder Proc., **18**, 228, 1959.
14. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., Биохимия, **26**, 1027, 1961.
15. Strickland E. H., Benson A. A., Arch. Biochem. Biophys., **88**, 344, 1960.
16. Gray G. M., Biochim. Biophys. Acta, **84**, 35, 1964.
17. Schwarz H. P., Dreisbach L., Pollis E., Pollis B. D., Soffer E., Arch. Biochem. Biophys., **111**, 422, 1965.
18. Murakami M., Ozawa Y., Funahashi S., J. Biochem. (Japan), **54**, 166, 1963.
19. Fleischer S., Klouwen H., Brierley G., J. Biol. Chem., **236**, 2936, 1961.
20. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Биохимия, **29**, 1111, 1964.
21. Крепс Е. М., в сб.: Функциональная эволюция нервной системы, изд. «Наука», Москва—Ленинград, **30**, 1965.
22. Mokrasch L. C., J. Neurochem., **13**, 49, 1966.
23. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Ж. эвол. биохимии и физиол., **1**, 16, 1965.

## О РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ СКОРОСТИ ОБМЕНА ФОСФОРА НЕКОТОРЫХ ФОСФОЛИПИДОВ ТКАНИ МОЗГА КРЫС

Т. Н. Иванова, Л. Н. Рубель, Н. А. Семенова

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Морфологическая и функциональная гетерогенность мозговой ткани, как известно, сильно затрудняет количественную оценку данных, полученных при изучении обмена мозга с помощью изотопного метода. Особенно наглядно это выявляется при исследовании метаболизма отдельных фосфолипидов (ФЛ)\* мозга. Их количественное содержание и интенсивность обмена, по многочисленным литературным данным (1—6 и др.), широко варьируют в зависимости от возраста животного и макро- и микроструктур ткани. Существенно влияет на метаболизм ФЛ мозга и функциональное состояние нервной системы. Литературные данные по этому вопросу не всегда сопоставимы из-за различия применяемых методик и способов расчета, а в ряде случаев и разноречивы (7, 8).

В настоящей работе мы попытались в однотипных условиях опыта дать сравнительную оценку скорости обмена фосфора отдельных ФЛ в зависимости от структурных особенностей мозговой ткани, возраста и функционального состояния животного.

Изучалась интенсивность включения  $P^{32}$  в два фосфолипида — фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА), которые составляют до 50—60% всех ФЛ мозга (4, 9). ФХ и ФЭА выделялись из больших полушарий мозга взрослых крыс, из некоторых отделов и микроструктур, из мозга крыс различного возраста и из мозга животных с измененным функциональным состоянием ЦНС, вызванным вибрацией. При этом фракция ФЭА анализировалась не суммарно, а делилась на диацильные и плазмалогенные формы (ФЭА-а и ФЭА-п).

---

\* В этой статье применены следующие дополнительные сокращения: ФЛ — фосфолипиды; ФХ — фосфатидилхолин; ФЭА — фосфатидилэтаноламин; БЭА-а — фосфатидилэтаноламин ацильный (диацильный); ФЭА-п — фосфатидилэтаноламин плазмалогенный.



Плазмалогенные ФЛ в настоящее время привлекают особое внимание исследователей. Они обнаружены во всех тканях животного организма. Особенно богата ими мозговая ткань, где ФЭА-п составляет около 10% от всех ФЛ (10). Основным плазмалогеном мозга является ФЭА-п, который определен в составе всех его субклеточных фракций (3). В белом веществе, спинном мозге и периферическом нерве от 87 до 99% ФЭА представлены в форме ФЭА-п (11). Количество плазмалогенов в мозге, в отличие от других тканей, значительно меняется с возрастом, достигая максимальной величины в период наиболее интенсивной миелинизации (12, 13). Показано, что в мозге крыс скорость включения радиоактивных предшественников, меченых  $P^{32}$  и  $C^{14}$ , в ФЭА-п значительно отличается от таковой соответствующих ФЭА-а (14, 15, 16).

Все эти факты заставляют думать об особой значимости данной группы соединений для функционирования нервной ткани. Однако до настоящего времени по этому вопросу нет определенного мнения, в связи с чем нам казалось интересным изучить и обмен ФЭА-п в плане нашего исследования.

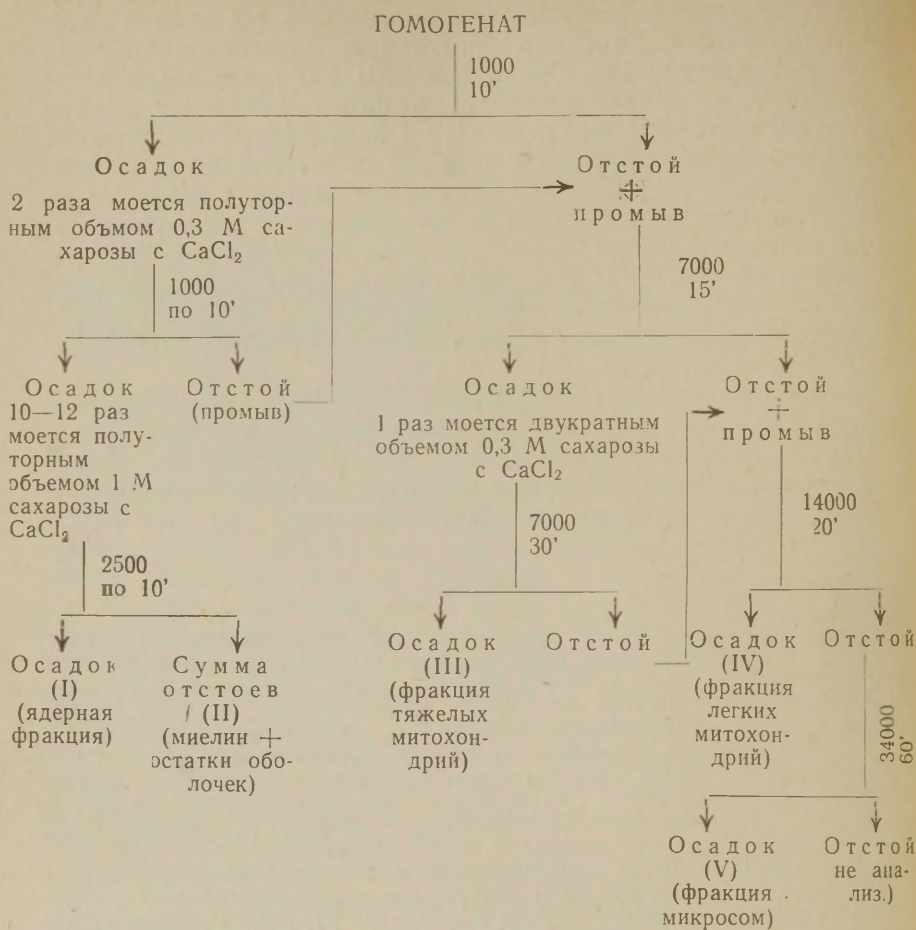
### Методика

Опыты ставили на белых крысах. Неорганический радиоактивный фосфат ( $P^{32}$ ) в количестве 2—5 мккюри/г веса тела вводили подкожно или интратрибушинно — в зависимости от цели опыта. Животных обезглавливали в пределах от 3 часов до 5 суток после введения  $P^{32}$ . Мозг быстро извлекали, тщательно обмывали 0,9% NaCl и освобождали от оболочек и сосудов. Все операции проводили на холоду. Навески мозга растирали и экстрагировали 30 минут хлороформ-метаноловой смесью (2:1) из расчета 24 объема растворителя на 1 г ткани мозга. Выделение ФХ, ФЭА-а и ФЭА-п проводили в форме продуктов их гидролиза, в основном по методу Даусона (9), с модификациями, указанными в нашей предыдущей работе (16). Фосфор определяли по Фиске и Суббароу, и в тех же окрашенных пробах подсчитывали их радиоактивность. Активность проб выражали либо в величинах удельной активности ( $У.А. = \text{имп./мин./мг } P$ ), либо в величинах относительной удельной активности:

$$О.У.А. = \frac{У.А. \text{ фосфора фракции} \times 100}{У.А. \text{ неорганического фосфора мозга}}$$

Хотя эти показатели и не позволяют сделать точный количественный расчет скоростей обмена изучаемых соединений (17), они являются вполне приемлемыми для сравнительной оценки обмена одних и тех же соединений в различных вариантах опытов.

Для изолирования субклеточных фракций навеску мозга измельчали на холоду в гомогенизаторе с 9 объемами 0,3 М сахарозы, содержащей 0,0018 М  $CaCl_2$ . Дальнейшее разделение вели по схеме 1. Фракции I, III, IV, V взвешивали в небольшом объеме 0,3 М сахарозы, гомогенизировали 1 мин и добавляли семикратный объем хлороформ-метаноловой смеси (1:1). После 10-минутной экстракции при 30°С к пробе добавляли хлороформ до соотношения его с метанолом 2:1 и экстрагировали еще 40 мин при комнатной температуре. К липидному экстракту добавляли 0,2 объема 0,9% NaCl и далее пробы обрабатывали так же, как и липидные фракции, выделенные из целого мозга.



### Результаты исследований

В таблице 1 приведены величины У.А. фосфора ФХ, ФЭА-а и ФЭА-п больших полушарий мозга взрослых крыс при различных сроках экспозиции (от 3 часов до 5 суток). Следует отметить, что во все временные сроки У.А. фосфора ФЭА-п была значительно ниже таковой ФЭА-а, составляя всего лишь 30% в 3-часовых опытах. В то же время У.А. фосфора ФХ и ФЭА-а во все исследованные сроки была примерно одного порядка, из чего можно заключить, что обмен фосфора этих двух ФЛ происходит примерно с одинаковой скоростью. Между тем, в более ранних исследованиях, когда определялась У.А. фосфора сум-

Таблица 1

Включение фосфора ( $P^{32}$ ) в некоторые фосфорсодержащие соединения больших полушарий мозга крыс при различных сроках экспозиции с  $P^{32}$

Время после введения $P^{32}$	Удельная активность фосфора (отсчеты/мин/мг фосфора)			% б/а
	ФХ	ФЭА-а (а)	ФЭА-п (б)	
3 часа	1300	1680	509	30
	1430	1670	517	31
1 день	17180	13040	7900	60
	15000	13000	8320	64
	32500	31500	20890	66
3 дня	33500	30040	20490	68
5 дней	40170	39800	29130	73
	48600	43300	30900	72

$P^{32}$  вводился подкожно в количестве 4,5 мккюри/г.

марной фракции ФЭА, для ФХ всегда получались более высокие величины скорости обмена его фосфора (17, 18).

У.А. фосфора ФХ, ФЭА-а и ФЭА-п, выделенных из различных отделов мозга крыс, представлены на рисунке 1. Наиболее

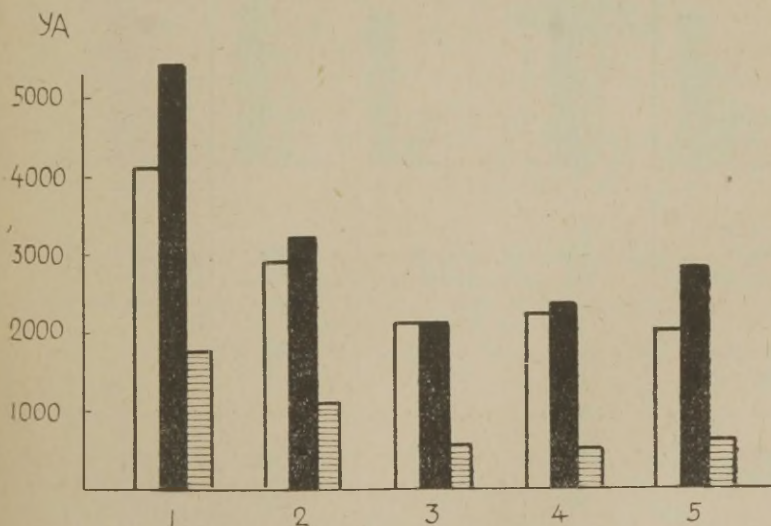


Рис. 1. Включение фосфора ( $P^{32}$ ) в отдельные фосфолипиды различных отделов мозга крыс.

1 — мозжечок; 2 — серое вещество; 3 — белое вещество; 4 — спинной мозг.

□ — ФХ; ■ — ФЭА-а; ▨ — ФЭА-п.



высокая У.А. фосфора исследованных ФЛ, в соответствии с литературными данными (19, 2), определена в мозжечке, самая низкая — в спинном мозге и белом веществе. Эти различия наиболее выражены для ФЭА-п (в 3 и более раза). Величины У.А. фосфора ФХ и ФЭА-а были очень близки между собой в каждом из отделов, кроме мозжечка, где У.А. ФЭА оказалась заметно выше.

Скорость включения  $P^{32}$  в ФЭА-п была значительно ниже, чем в ФЭА-а во всех отделах мозга. В спинном и продолговатом мозге У.А. фосфора ФЭА-п составляла всего лишь 14—24% от У.А. ФЭА-а. Следовательно, наиболее низкий обмен происходит в тех отделах, где ФЭА-п составляет основную массу ФЛ (11). Более высокие величины У.А. фосфора ФЭА-п в мозжечке и сером веществе, видимо, обусловлены тем, что здесь они являются компонентами не миелиновых образований, а самих нервных клеток.

Результаты опытов, касающихся обмена фосфора исследуемых ФЛ в некоторых субфракциях мозга крыс, приведены в таблице 2.

Таблица 2

Включение фосфора ( $P^{32}$ ) в отдельные фосфолипиды некоторых субклеточных фракций больших полушарий мозга крыс

	Время в часах после введения $P^{32}$	Удельная активность фосфора (отсчеты/мин/мг Р)			% б/а
		ФХ	ФЭА-а (а)	ФЭА-п (б)	
Фракция тяжелых митохондрий	11	5400	4600	—	—
	13	12980	13890	7610	55
	40	16610	15600	12000	77
Фракция легких митохондрий	11	—	—	—	—
	13	12950	18840	11050	59
	40	17000	16460	11670	71
Фракция микросом	11	14840	11430	—	—
	13	20310	25570	—	—
Ядерная фракция	11	9750	7270	—	—
	13	17200	17840	10190	57
	40	19400	15700	12070	74

В каждом опыте для получения субклеточных фракций использовали среднюю пробу мозга 8—12 животных. Изотоп вводился подкожно:

- 11 час. — в количестве 3 мккюри/г,
- 13 час. — в количестве 4,5 мккюри/г,
- 40 час. — в количестве 2 мккюри/г.

На основании данных по интенсивности включения  $P^{32}$  в ФХ и ФЭА-а выделенные субфракции можно расположить в следующий нисходящий ряд: фракции микросом, ядер, легких митохондрий и тяжелых митохондрий, что в основном совпадает с данными литературы в отношении обмена общих ФЛ (7).

Полученные нами субклеточные фракции не подвергались дальнейшей очистке в градиенте плотности и, возможно, содержали некоторые примеси миеллина и нервных окончаний. Однако во всех исследованных фракциях, как и в целом мозге, фосфор ФЭА-а обменивался значительно быстрее, чем фосфор ФЭА-п.

ОУА

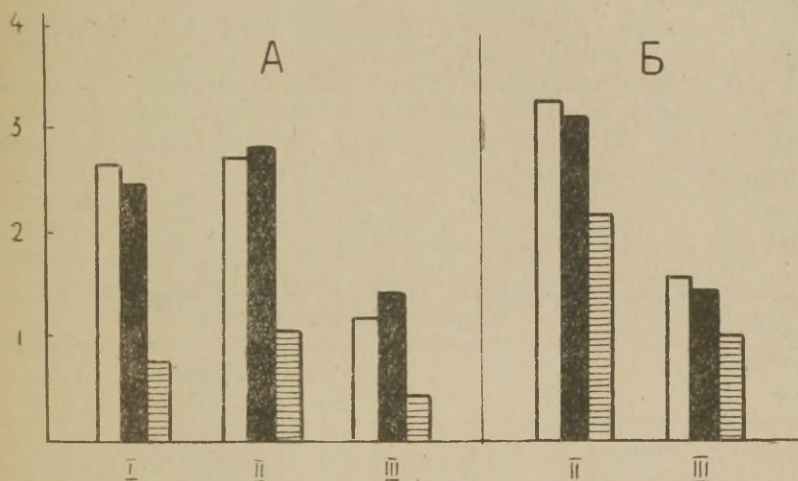


Рис. 2. Включение фосфора ( $P^{32}$ ) в отдельные фосфолипиды больших полушарий мозга крыс различного возраста.

Экспозиция с  $P^{32}$ : А — 3 часа, Б — 3-е суток. Возраст животных: I — 13 дней, II — 35 дней, III — взрослые.

□ — ФХ, ■ — ФЭА-а, ▨ — ФЭА-п.

На рис. 2 приведены данные о скорости включения  $P^{32}$  в ФХ, ФЭА-а и ФЭА-п больших полушарий мозга крыс 13- и 35-дневного возраста и взрослых животных при 3-часовой и 3-суточной экспозиции. Результаты здесь выражены в величинах ОУА, т. к. этот показатель в данных условиях опыта позволяет более правильно оценить интенсивность обмена ФЛ с учетом возрастных различий в скорости проникновения меченого фосфора из крови в мозг.

Величины О.У.А. фосфора исследованных ФЛ в мозге взрослых крыс при обоих сроках экспозиции были значительно (до 100% и более) ниже, чем в мозге молодых животных, что согласуется с литературными данными (18, 19). У крыс 13- и 35-дневного возраста заметных различий в величинах этих показателей не наблюдалось, лишь в мозге 35-дневных животных О.У.А. ФЭА-п была несколько выше, чем в мозге 13-дневных.

Скорость обмена фосфора ФЭА-п в мозге молодых крыс, так же как и у взрослых, была значительно ниже, чем у ФЭА-а. Эти факты не подтвердили литературных указаний (20), согласно которым у 15-дневных крыс к моменту наибольшей миелинизации У.А. фосфора ФЭА-п превосходила таковую ФЭА-а. Сравнение величин О.У.А. ФХ и ФЭА-а показало, что обмен их фосфора и у молодых животных происходит примерно с одинаковой скоростью.

В таблице 3 суммированы данные двух серий опытов по скорости включения  $P^{32}$  в ФЛ мозга крыс с измененным функциональным состоянием ЦНС, вызванным воздействием вибрации. Этот фактор, по многочисленным литературным данным, обуславливает заметные сдвиги в ряде физиологических функций человека и животных.

Таблица 3

Влияние трехчасовой вибрации на О.У.А. фосфора отдельных ФЛ больших полушарий мозга \*

		ФХ	ФЭА-а	ФЭА-п
1-я	Контроль	$1,76 \pm 0,12$ (4)	$2,09 \pm 0,03$ (4)	$0,57 \pm 0,01$ (3)
серия	Вибрация	$2,52 \pm 0,13$ (4) $P < 0,01$	$2,71 \pm 0,18$ (4) $P < 0,05$	$0,84 \pm 0,04$ (4) $P < 0,05$
2-я	Контроль	$0,99 \pm 0,07$ (3)	$1,30 \pm 0,07$ (3)	$0,27 \pm 0,02$ (4)
серия	Вибрация	$1,29 \pm 0,07$ (3) $P < 0,05$	$1,21 \pm 0,01$ (3) $P > 0,02$	$0,50 \pm 0,04$ (4) $P < 0,01$

\* Данные выражены в величинах О.У.А. =  $\frac{\text{У.А. фосфора фракции} \times 100}{\text{У.А. неорганического фосфора мозга}}$

Цифры в скобках — количество опытов; количество вводимого  $P^{32}$  — 4 мккюри/г; частота вибрации 25 гц при амплитуде 3 мм; экспозиция — 3 часа.



Применялась вибрационная установка типа ВУ 5/500. Вертикальную вибрацию проводили прерывисто, в течение 3 часов, по 20 минут с 10-минутным перерывом при частоте 25 гц и с амплитудой 3 мм. Ректальная температура подопытных животных не отличалась от таковой контрольных, и количество фосфора общих ФЛ в мозговой ткани оставалось в пределах нормы.

Как следует из цифрового материала, выраженного в величинах О.У.А., вибрация вызывает статистически достоверное увеличение скорости включения  $P^{32}$  во все исследованные ФЛ мозга (кроме ФЭА-а во 2-й серии опытов). Наиболее выраженные различия при этом обнаружены для фосфора ФЭА-п. В плане всех изученных нами вариантов изменение скорости обмена фосфора ФЛ под влиянием вибрации было наименьшим.

### Обсуждение результатов

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что в мозге крыс включение  $P^{32}$  в плазмалогенные формы ФЭА происходит медленнее, чем в соответствующие диацильные производные. Это показано для мозга молодых и взрослых животных, в функционально отличных его отделах и в основных субклеточных структурах.

В этих же вариантах опытов интенсивность обмена фосфора ФХ и ФЭА-а была примерно одного порядка. Аналогичные данные для целого мозга получены в одной из последних работ французских авторов (6). Эти факты подтверждают существующее мнение о возможности перехода одних форм ФЛ в другие (21, 22).

На основании имеющихся в литературе данных о преобладании плазмалогенных ФЛ в проводниковых структурах мозговой ткани и о значительном увеличении их количества в развивающемся мозге, большинство авторов основную функцию плазмалогенов связывает с процессами миелинизации. Однако ряд работ последнего времени заставляет думать о какой-то дополнительной и весьма существенной роли этой группы соединений для функционирования нервной ткани. Об этом свидетельствует наличие значительных количеств ФЭА-п в митохондриях мозга кур еще до начала активной миелинизации (23), а также присутствие плазмалогенных ФЛ во всех субклеточных фракциях мозга. Значительные количества ФЭА-п были найдены в изолированных нейронах слуховых ядер мозга быка, а ФЛ нейронов ганглия *Aplisia punctata* Cavier оказались в основном состоящими из плазмалогенных форм (24).

Установленный в настоящей работе факт значительного увеличения интенсивности включения  $P^{32}$  в ФЭА-п мозга крыс, под-

вергнутых вибрации, также является веским аргументом, подтверждающим специфическую роль плазмалогенных ФЛ в функционировании мозга.

Согласно предыдущим исследованиям (7, 17—19), скорость обмена фосфора общих ФЛ и некоторых их представителей широко варьирует в различных анатомических отделах мозга. Для изученных нами соединений (рис. 1) эти различия иногда достигали 200 и более процентов.

В субклеточных фракциях мозга обнаружены почти все индивидуальные ФЛ (3, 4). По данным настоящей работы, интенсивность обмена фосфора ФХ, ФЭА-а и ФЭА-п в отдельных субфракциях была неодинаковой; различия в ряде случаев оказались весьма значительными (табл. 2).

Однако из сопоставления результатов настоящей работы и вышеприведенных литературных данных отчетливо видно, что наиболее выраженные различия в скорости обмена фосфора отдельных ФЛ мозга обусловлены особенностями химической структуры самих соединений. Например, в опытах *in vivo* на целом мозге показано (25, 26), что скорость включения  $P^{32}$  в инозитолфосфатиды почти в 10 раз превышает таковую суммарных ФЛ. Даже такие, казалось бы, близкие по своему строению ФЛ, как диацильные и плазмалогенные формы ФЭА по интенсивности обмена фосфора отличаются в три и более раза.

Все эти факты заставляют предполагать, что в молекуле ФЛ интенсивность обмена фосфора определяется в значительной степени и неполярным участком молекулы. Можно допустить, что и отдельные молекулы одного и того же ФЛ, в зависимости от состава жирных кислот, будут обменивать свой фосфор с различной скоростью, что действительно подтвердилось в опытах с тканью печени (27, 28).

### Выводы

Изучалась скорость включения неорганического радиоактивного фосфата ( $P^{32}$ ) в фосфатидилхолин, диацильные и плазмалогенные формы фосфатидилэтаноламина, выделяемые из различных структурных образований мозга взрослых крыс, из мозга молодых животных и из мозга крыс с измененным под влиянием вибрации функциональным состоянием.

Показано, что в целом мозге взрослых крыс, в различных его отделах и микроструктурах, а также в мозге животных 13- и 35-дневного возраста фосфор плазмалогенной формы ФЭА обменивается медленнее, чем фосфор диацильного ФЭА.

Во всех случаях включение фосфора в ФХ и диацильный ФЭА происходит примерно с одинаковой скоростью.

Скорость обмена фосфора исследуемых ФЛ мозга в первую

очередь обусловлена химической природой самого соединения и в меньшей степени зависит от типа структурных образований, а также возраста и функционального состояния животного.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Folch J., *Biochemistry of the Developing Nervous System*. Acad. Press, New-York, p. 121, 1955.
2. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., ДАН СССР, **27**, 85, 1962.
3. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C., *Biochem. J.*, **92**, 91, 1964.
4. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченькаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Биохимия, **29**, 1111, 1964.
5. Davison A. N., Dobbing J., *Biochem. J.*, **75**, 565, 571, 1960.
6. Freysz L., Bieth R., Mandel P., *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*, **47**, 1441, 1965.
7. Harth S., Borkowski T., Hardell R., Mandel P., *Exper. cell Res.*, **26**, 587, 1962.
8. Abdel-Latif A. A., Abood L. G., *J. Neurochem.*, **12**, 157, 1965.
9. Dawson R. M. C., Hemington N., Davenport J. B., *Biochem. J.*, **84**, 497, 1962.
10. Debuch H., *Z. physiol. Chem.*, **338**, 1, 1964.
11. Webster G. K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **44**, 109, 1963.
12. Korey S. R., Orchen M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 381, 1959.
13. Bieth R., Freysz L., Mandel P., *Biochim. Biophys. Acta.*, **53**, 576, 1961.
14. Freysz L., Bieth R., Mandel P., *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 576, 1961.
15. McMurray W. C., *J. Neurochem.*, **11**, 315, 1964.
16. Рубель Л. Н., Иванова Т. Н., ДАН СССР, **165**, 943, 1965.
17. Иванова Т. Н., Правдина Н. И., Рубель Л. Н., Биохимия, **30**, 216, 1965.
18. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Биохимия, **28**, 246, 1963.
19. Смирнов А. А., Четвериков Д. А., ДАН СССР, **90**, 631, 1953.
20. Bieth R., Freysz L., Nussbaum J. L., Mandel P., *J. Physiol. (Paris)*, **54**, 294, 1962.
21. Крепс Е. М., Усп. соврем. биол., **41**, 261, 1956.
22. Rossiter K., *J. Clin. Chem.*, **11**, 171, 1965.
23. Патрикеева М. В., *Вопр. мед. химии*, **11**, вып. 2, 99, 1965.
24. Roots B. G., Johnston P. V., *Biochem. J.*, **94**, 61, 1965.
25. Ansell G. B., Dohmen H., *J. Neurochem.*, **2**, 1, 1957.
26. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., Биохимия, **26**, 1027, 1961.
27. Collins F. D., *Nature*, **183**, 366, 1960.
28. Harris P. M., Robinson D. S., Getz G., *Nature*, **188**, 742, 1960.



## ДИНАМИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ОБМЕНА ОТДЕЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ ФОСФОЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В ПОСТГИПОКСИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

В. Я. Дворкин

Лаборатория регуляции метаболизма мозга Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Современный период изучения биохимии фосфолипидов (ФЛ) в нервной ткани характеризуется попытками выяснения роли как всей группы ФЛ, так и отдельных ее представителей в жизнедеятельности нервной ткани. Высокое содержание ФЛ в тканях нервной системы (1), преимущественная локализация их в мембранных структурах (2, 3), накапливающиеся из года в год сведения об участии отдельных представителей ФЛ в явлениях проницаемости и переноса веществ, в частности, катионов, через мембраны нервных клеток (4—6), наконец, имеющийся уже ряд фактов о чувствительности обмена ФЛ мозговой ткани к действию факторов, изменяющих функциональное состояние ЦНС (1, 7, 8) — все это позволяет предполагать важную, но пока еще далеко не выясненную роль ФЛ в осуществлении специфических функций нервной системы.

Одним из путей выяснения этой роли ФЛ является изучение их обмена в нервной ткани при различных экспериментальных воздействиях. Для понимания причин и механизмов возникновения изменений в обмене того или иного ФЛ под влиянием определенного воздействия необходимо знать пути распада и синтеза отдельных ФЛ в клетке, ибо очевидно, что для ФЛ, как и для других пластических веществ, регуляция их метаболизма на клеточном уровне осуществляется через изменение скоростей соответствующих ферментативных реакций.

В настоящее время в результате большого количества исследований выяснены основные реакции биосинтеза ФЛ в тканях, в том числе и в тканях ЦНС (3, 9, 10). Показано, что пути биосинтеза отдельных представителей ФЛ в нервной ткани существенно различны как по своим непосредственным предшествен-

никам, так и по своей связи с определенными внутриклеточными структурами. Так, в биосинтезе таких ФЛ, как фосфатидилхолины (ФХ) и фосфатидилэтаноламины (ФЭА), составляющих основную массу ФЛ нервной ткани, используются в качестве непосредственного предшественника фосфатной группы соответствующие фосфорилированные основания, тогда как фосфатидные кислоты (ФК) и монофосфоинозитиды (МФИ) используют фосфор  $\alpha$ -глицерофосфата. Особые пути биосинтеза предполагаются для фосфатидилсеринов (ФС), плазмалогенов (ПЛ), ди- и три-фосфоинозитидов (9). Принципиально важным является установленный в последние годы факт, что помимо основных путей биосинтеза ФЛ, требующих для своего осуществления АТФ, специфических кофакторов в виде ЦТФ и аэробных условий, существуют и другие, альтернативные пути, не требующие присутствия этих факторов и использующие реакции обмена азотистых оснований и других групп в молекулах ФЛ (3, 9). Существование различных путей биосинтеза для различных ФЛ, а также возможность множественности путей биосинтеза для одного и того же ФЛ делают целесообразным изучение изменений обмена отдельных ФЛ при различных воздействиях, ибо различная степень торможения или, наоборот, стимуляции синтеза того или иного ФЛ, выявляемая с помощью радиоактивных предшественников, могла бы свидетельствовать о различной чувствительности отдельных этапов реакций биосинтеза ФЛ к определенным воздействиям.

В литературе имеются указания на различную чувствительность отдельных ферментных систем, участвующих в биосинтезе ФЛ, к воздействию некоторых патогенных факторов. Так, в работах Анселла и сотр. (11, 12) было показано, что хлорпромазин в концентрации  $10^{-4}$  М более чем на 50% угнетал включение  $R^{32}$ -фосфорилхолина и  $R^{32}$ -фосфорилэтаноламина в соответствующие ФЛ срезов коры мозга, но это угнетающее действие хлорпромазина отсутствовало, если фосфорилированные основания были уже в форме цитидиндифосфатэфиров. На основании этих данных авторы высказали предположение о том, что хлорпромазин блокирует образование комплекса между фосфорилированным основанием и ЦТФ, ингибируя фермент фосфорилцитидилтрансферазу, и не влияет на ферментные системы, катализирующие перенос фосфорилированного основания с цитидиновых коферментов на диглицерид. В другой работе, также вышедшей из лаборатории Анселла (13), было установлено, что тиопенталовая анестезия подавляет включение  $R^{32}$ -ортофосфата в ФХ и ФЭА срезов коры головного мозга, но не влияет на включение  $R^{32}$  в фосфорилхолин и фосфорилэтаноламин, т. е., как и при действии хлорпромазина, наиболее чувствительным звеном в цепи реакций биосинтеза этих ФЛ оказалась реакция соединения уже фосфорилированных оснований с ЦТФ. Нельсон



и Барнум (14), изучая влияние диизопропилфторфосфата на обмен ФЛ в мозгу мышей, показали, что в основе угнетающего действия этого ингибитора на включение  $P^{32}$  в ФЛ лежит блокада ингибитором конечных стадий образования ФЛ. Результаты этих исследований согласуются с существующим в литературе мнением о том, что реакцией, лимитирующей скорость всех реакций в цепи биосинтеза ФХ и ФЭА, является перенос фосфорилированных оснований на ЦТФ, катализируемый соответствующей фосфорилхолин- или фосфорилэтаноламинцитидилтрансферазой (15).

В ходе проводимых в нашей лаборатории исследований по изучению влияния кислородного голодания организма на обмен ФЛ в головном мозгу была установлена различная степень депрессии обмена отдельных фракций ФЛ головного мозга крыс при гипоксии. Эта различная чувствительность проявлялась как в разной степени подавления обмена отдельных фракций ФЛ при одной и той же степени гипоксии, так и в неодинаковой реакции со стороны обмена отдельных фракций на углубление гипоксии (16—18). Очевидно, что причину этих различий следует искать в разной чувствительности отдельных реакций биосинтеза ФЛ к кислородному голоданию.

Одним из путей для понимания поведения разных фракций ФЛ в условиях кислородного голодания организма является выяснение характера и динамики восстановления интенсивности обмена различных фракций ФЛ в постгипоксическом периоде. Можно было предполагать, что раннее восстановление обмена одних фракций и более позднее восстановление обмена других позволяет получить дополнительные сведения о различной степени подавления разных ферментных систем биосинтеза отдельных ФЛ в условиях гипоксии. Далее, учитывая тот факт, что постгипоксическое восстановление обмена отдельных ФЛ идет в условиях, в которых ход обычных путей биосинтеза может быть затруднен в результате дефицита в мозговой ткани АТФ и ЦТФ (19, 20), можно предполагать, что изучение динамики постгипоксического восстановления обмена отдельных фракций ФЛ может явиться методом выявления возможных иных путей биосинтеза.

Изучение динамики восстановления интенсивности обмена фосфатной группы отдельных фракций ФЛ в больших полушариях головного мозга крыс в первые часы после перенесенной острой гипоксии и составило задачу настоящей работы.

### Методика

Опыты проводили на взрослых белых крысах-самцах линии Вистар. Постгипоксическое восстановление обмена ФЛ изучали после пребывания животных в условиях гипоксии различной степени тяжести. С этой целью



первая группа крыс в течение 110 мин находилась в барокамере при давлении 240 мм рт. ст., вторая группа крыс в течение такого же срока находилась в барокамере при давлении 180 мм рт. ст. Режим подъема и поведение животных в барокамере при этих условиях были описаны ранее (18). Крысам обеих групп вводили радиоактивный фосфат ( $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{P}_4\text{O}_{10}$ ) из расчета 5 мкюри на г веса животного непосредственно перед помещением в барокамеру и сразу или через 2 часа после извлечения из барокамеры. Животных забивали всегда ровно через 120 мин после введения изотопа. Таким образом, интенсивность обмена фосфатных групп ФЛ исследовали за время пребывания животных в барокамере и за периоды 0—2 и 2—4 часа после перенесенной гипоксии. Контрольные группы крыс находились при нормальном атмосферном давлении.

Обработку ткани, экстракцию ФЛ и фракционирование ФЛ-экстракта проводили по описанной ранее схеме (17, 18). Разделение фракции аминоксидов (АФЛ) на ФЭА-а и ФЭА-п формы проводили с помощью мягкого щелочного гидролиза по прописи Досона (21). В каждой фракции ФЛ определяли содержание фосфора и его радиоактивность и рассчитывали О.У.А., которая представляла собой отношение У.А. каждой фракции к У.А. неорганического фосфора ткани мозга, выраженное в процентах.

## Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, степень депрессии обмена отдельных фракций ФЛ оказалась неодинаковой как при одной, так и при другой степени гипоксии. Эти данные полностью соответствуют полученным ранее и были в свое время обсуждены (17, 18).

Характер восстановления интенсивности обмена исследованных фракций также оказался неодинаковым для различных фракций ФЛ. Так, из табл. 1 видно, что О.У.А. фракций ФК, ФИ и СФМ у крыс первой группы нормализуется уже в период 0—2 часа после барокамеры и в период 2—4 часа не отличается от контроля. У крыс второй группы О.У.А. этих фракций ФЛ в период 0—2 часа статистически достоверно повышается, хотя остается еще ниже контрольных величин, и в срок 2—4 часа О.У.А. фракций ФК, ФИ и СФМ полностью нормализуется.

Обращает на себя внимание особый характер постгипоксического восстановления фракций АФЛ и ФХ (рис. 1). У крыс первой группы во время пребывания в барокамере степень снижения О.У.А. этих двух фракций одинакова. Далее, в первый постгипоксический срок (0—2 часа) О.У.А. фракции АФЛ восстанавливается, достигая контрольных величин, тогда как О.У.А. фракции ФХ остается на том же низком уровне, что и при гипоксии. Нормализация обмена ФХ наступает лишь в период 2—4 часов после гипоксии, а О.У.А. фракции в этот период статистически достоверно превышает уровень контроля. У крыс второй группы во время пребывания в барокамере О.У.А. фракций АФЛ и ФХ снижается также одинаково. В период 0—2 часов после барокамеры О.У.А. фракции АФЛ значительно повышается и почти достигает контрольных величин ( $P=0,05$ ). О.У.А. фракции ФХ в этот период, как и у крыс первой группы, остается таким же низким, как во время пребы-

О.У.А. отдельных фракций ФЛ больших полушарий головного мозга крыс при гипоксии и в постгипоксическом периоде

		Показатель	Суммарные ФЛ	Фракции ФЛ				
				I (ФК + ПГФ)	II (АФЛ)	III (ФИ)	IV (ФХ)	V (СФМ)
1		2	3	4	5	6	7	8
1-я группа крыс (240 мм рт. ст.)								
Контроль		$\bar{x} \pm S$	$2,05 \pm 0,08$	$6,79 \pm 0,62$	$0,83 \pm 0,07$	$9,33 \pm 0,51$	$1,53 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,02$
Барокамера		$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$1,29 \pm 0,06$ 62,7 < 0,001	$5,03 \pm 0,19$ 74,1 < 0,02	$0,52 \pm 0,03$ 62,6 < 0,001	$6,68 \pm 0,37$ 71,7 < 0,001	$0,90 \pm 0,04$ 58,9 < 0,001	$0,28 \pm 0,02$ 77,9 > 0,10
После барокамеры	0—2 ч.	$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$1,80 \pm 0,06$ 88,0 < 0,05	$6,37 \pm 0,43$ 94,0 > 0,10	$0,79 \pm 0,03$ 95,3 > 0,10	$9,92 \pm 0,58$ 106,5 > 0,10	$0,99 \pm 0,04$ 64,7 < 0,001	$0,34 \pm 0,05$ 94,5 > 0,10
	2—4 ч.	$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$2,32 \pm 0,13$ 113,0 0,10 < P > 0,05	$7,89 \pm 0,54$ 116,1 > 0,10	$1,14 \pm 0,06$ 137,5 < 0,01	$10,40 \pm 1,17$ 111,5 > 0,10	$1,63 \pm 0,12$ 106,5 > 0,10	$0,49 \pm 0,19$ 136,0 > 0,10

		1	2	3	4	5	6	7	8
2-я группа крыс (180—200 мм рт. ст.)									
Контроль			$\bar{x} \pm S$	$1,88 \pm 0,07$	$5,10 \pm 0,26$	$0,79 \pm 0,03$	$7,92 \pm 0,37$	$1,29 \pm 0,06$	$0,35 \pm 0,02$
Барокамера			$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$1,13 \pm 0,04$ 60,2 < 0,001	$3,68 \pm 0,14$ 72,2 < 0,001	$0,48 \pm 0,04$ 60,6 < 0,001	$4,61 \pm 0,28$ 58,3 < 0,001	$0,67 \pm 0,05$ 51,9 < 0,001	$0,23 \pm 0,02$ 65,7 < 0,001
После барокамеры	0—2 ч.		$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$1,36 \pm 0,07$ 72,2 < 0,001	$4,12 \pm 0,23$ 80,7 < 0,01	$0,67 \pm 0,05$ 84,5 = 0,05	$6,63 \pm 0,37$ 83,7 < 0,02	$0,71 \pm 0,06$ 54,9 < 0,001	$0,23 \pm 0,02$ 65,7 < 0,01
	2—4 ч.		$\bar{x} \pm S$ % к контр. P	$1,93 \pm 0,10$ 102,5 > 0,10	$4,96 \pm 0,28$ 97,3 > 0,10	$0,93 \pm 0,05$ 117,3 < 0,02	$8,81 \pm 0,41$ 111,2 > 0,10	$1,24 \pm 0,08$ 95,9 > 0,10	$0,38 \pm 0,04$ 109,9 > 0,10



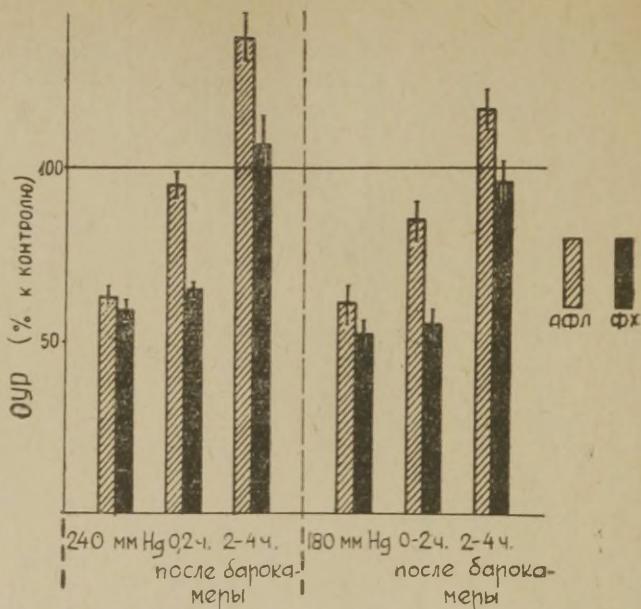


Рис. 1. Изменения О.У.А. (О.У.Р.) фракций аминоксфатидов (АФЛ) и фосфатидилхолинов (ФХ) в больших полушариях головного мозга крыс при гипоксии и в постгипоксическом периоде.

Заштрихованные столбики — АФЛ. Черные столбики — ФХ.

вания в барокамере. О.У.А. фракции ФХ восстанавливается лишь в период 2—4 часов после гипоксии, а О.У.А. фракции АФЛ в этот период, как и у крыс первой группы, достоверно превышает уровень контроля.

Таким образом, независимо от тяжести перенесенной гипоксии, интенсивность обмена АФЛ восстанавливается уже в первые 2 часа после пребывания животных в барокамере, тогда как синтез ФХ в этот период еще остается подавленным и восстанавливается лишь в период 2—4 часов на фоне, превышающем контрольные величины интенсивности обмена фракции АФЛ. Другими словами, на протяжении 4-часового постгипоксического периода восстановление и нормализация обмена АФЛ предшествует нормализации обмена ФХ.

Как видно из рис. 1, эта различная последовательность восстановления обмена АФЛ и ФХ не может быть объяснена различной степенью подавления синтеза этих ФЛ во время пребывания животных в барокамере, ибо у крыс обеих групп эта разница статистически не достоверна.

Установленные особенности динамики восстановления интенсивности обмена фракций АФЛ и ФХ наводят на мысль о том, что ранняя нормализация обмена АФЛ является необходимым условием для последующего восстановления нормальной интенсивности обмена ФХ в постгипоксическом периоде.

Возникает вопрос, в какой степени правомерным может быть предположение о том, что в постгипоксических условиях АФЛ являются предшественником в биосинтезе ФХ в мозговой ткани. АФЛ, представленные в головном мозгу преимущественно ФЭА (22) и ФХ, близки между собой как по строению, так и по путям биосинтеза. Известно, что ФХ и ФЭА имеют общие пути биосинтеза, общих предшественников и общие места связывания ферментных систем, что обуславливает возможность конкурентных взаимоотношений между этими двумя ФЛ (9). В то же время именно для ФХ, который является наиболее изученным ФЛ и присутствует в наибольших количествах в тканях нервной системы, показана возможность нескольких путей биосинтеза, причем наиболее важными из них считаются следующие два пути. Первый путь, общий с ФЭА, описанный Кеннеди для печени (23) и подтвержденный для мозга исследованиями Росситера и Стрикленда (24, 25). Этот путь требует для своего осуществления аэробных условий, присутствия оптимальных концентраций АТФ и ЦТФ, стимулируется  $Mg^{2+}$  и угнетается  $Ca^{2+}$  и связан преимущественно с митохондриями. Второй путь — это путь ступенчатого метилирования уже предсуществующего ФЭА до ФХ. В отличие от первого, «классического» пути, второй путь может протекать в анаэробных условиях, он не требует для своего осуществления свободных АТФ и ЦТФ, активируется  $Ca^{2+}$  и структурно связан с микросомами (26, 27).

На основании полученных нами результатов можно предположить, что в постгипоксических условиях биосинтез ФХ идет не по основному пути, а по альтернативному, являющемуся, по-видимому, в этих условиях энергетически более выгодным для нервных клеток. Характер восстановления обмена фракции АФЛ может быть, таким образом, отражением возрастающей в постгипоксических условиях роли этой фракции в биосинтезе ФХ.

Этому предположению о возможной генетической связи между АФЛ и ФХ и о роли ФЭА как предшественника в биосинтезе ФХ противоречат результаты изотопных исследований, свидетельствующие о более низких величинах О.У.А. фосфатной группы ФЭА в мозговой ткани по сравнению с соответствующими величинами для ФХ (28, 29). В наших опытах (табл. 1) О.У.А. фракции АФЛ была также всегда ниже О.У.А. фракции ФХ. При дальнейших рассуждениях следует, однако, учитывать то важное обстоятельство, что фракция АФЛ мозговой ткани состоит из диацильных и плазмалогенных форм АФЛ (АФЛ-а и АФЛ-п), причем в целом мозгу АФЛ-п состав-



ляют около половины суммарных АФЛ. Недавними исследованиями Рубель и Ивановой (30) было показано, что величины О.У.А. ФЭА-п были значительно ниже (в среднем в 4 раза), чем величины О.У.А. ФЭА-а, а сравнительное изучение интенсивности обмена фосфатной группы ФЭА и ФХ, отделенных от плазмалогенных форм, показало, что во всех отделах головного мозга крыс величины У.А. ФЭА-а были равны или даже выше величин У.А. для ФХ. В аспекте наших рассуждений следует учитывать, что предшественником ФХ могут быть только диацильные формы АФЛ.

Таким образом, очевидно, что для подтверждения высказанного предположения о возможной роли АФЛ как предшественников в биосинтезе ФХ в мозговой ткани в постгипоксических условиях следовало провести сравнительное изучение изменений О.У.А. АФЛ-а и ФХ при гипоксии и в постгипоксическом периоде.

Для разделения АФЛ на диацильные и плазмалогенные формы был использован метод мягкого щелочного гидролиза по Даусону (21). Известно, что в мозговой ткани почти отсутствуют холин-ПЛ и все ПЛ головного мозга, которые, по данным разных авторов, составляют 25—30% общих ФЛ мозговой ткани (22, 30, 31), представлены АФЛ-п, причем почти исключительно ФЭА-п и лишь в небольших количествах — ФЛ-п. Получаемая в условиях нашей схемы фракционирования ФЛ фракция АФЛ содержит, таким образом, практически все ПЛ-формы ФЛ мозговой ткани.

Соотношение О.У.А. АФЛ-а и ФХ при гипоксии и в постгипоксическом периоде показано на рис. 2. Как видно из него, О.У.А. суммарных АФЛ как у контрольных животных, так и во время пребывания в барокамере и после гипоксии, была всегда ниже, чем О.У.А. ФХ. Величины О.У.А. АФЛ-а у контрольных животных также ниже величин О.У.А. для ФХ. Однако в постгипоксическом периоде картина существенно меняется. Обращает на себя внимание тот факт, что в период 0—2 часов после гипоксии величины О.У.А. АФЛ-а статистически достоверно ( $P < 0,02$ ) выше О.У.А. фракции ФХ. В период 2—4 часов после гипоксии, когда О.У.А. фракции ФХ нормализуется, разница между величинами О.У.А. для АФЛ-а и ФХ отсутствует.

Тот факт, что в период 0—2 часов после гипоксии, когда, как было сказано выше, синтез ФХ остается еще подавленным, О.У.А. АФЛ-а отчетливо выше величин О.У.А. для ФХ. Это является принципиально важным и служит, следовательно, экспериментальным подтверждением высказанного выше предположения о том, что в условиях постгипоксического восстановления фракция АФЛ может быть предшественником ФХ в головном мозгу крыс. Характерно также то, что подобная зависимость между АФЛ и ФХ отсутствует у контрольных крыс и в период



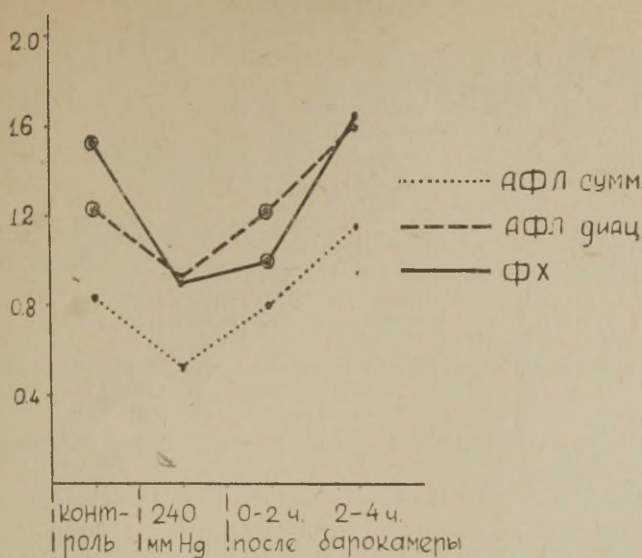


Рис. 2. Изменения О.У.А. диацильных аминоксфатидов (АФЛ-а), суммарных АФЛ и фосфатидилхолинов (ФХ) в больших полушариях головного мозга крыс при гипоксии и в постгипоксическом периоде.

Кружками обозначены величины О.У.А. АФЛ-а и ФХ, статистически достоверно отличающиеся друг от друга. (У контрольных крыс  $P = 0,02$ , в период 0—2 часов  $P < 0,02$ .)

2—4 часов после гипоксии, когда обмен ФХ восстанавливается, и обнаруживается только в период 0—2 часов, т. е. специфична для периода начального постгипоксического восстановления.

Биологический смысл полученных фактов следует искать как в особенностях взаимоотношений отдельных ФЛ мозговой ткани, так и в общих закономерностях процессов восстановления. По-видимому, в таких специальных условиях, как постгипоксическое восстановление, когда в тканях происходит восстановление биохимических систем и функций, нарушенных в результате кислородного голодания, особое значение приобретает экономное расходование энергетических ресурсов. Отсюда понятно, что в каждом отдельном случае процессы восстановления идут по энергетически более выгодному пути. Показанная нами возможность резервного пути синтеза ФХ из ФЭА в постгипоксическом периоде может служить одним из доказательств подобного предположения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крепс Е. М., Усп. соврем. биол., **41**, 261, 1956.
2. Крепс Е. М., Укр. биохим. журн., **37**, 734, 1965.
3. Van Deenan L. L. M., in: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, v. VIII, p. 1, Perg. Press, 1965.
4. Tobias J. H., J. Cell, Comparat. Physiol., **46**, 183, 1955.
5. Gardiner J. E., Biochem. J., **85**, 32P, 1963.
6. Miani N., J. Neurochem., **10**, 859, 1963.
7. Dawson R. M. C., Richter D., Proc. Roy. Soc., **137**, Ser. B, 252, 1950.
8. Ansell G. B., in: Structure and Functions of the Cerebral Cortex, ed. by Tower D. B. and Schade J. P., Amsterdam, 1959.
9. Стрикленд К., В кн. Биогенез природных соединений, М., **81**, 1965.
10. Ansell G. B., Hawthorne J. N., Phospholipids, chemistry, metabolism and function, B. B. A.-Library, v. 3, 1964.
11. Ansell G. B., Marshall E. F., J. Neurochem., **10**, 875, 1963.
12. Ansell G. B., Marshall E. F., J. Neurochem., **10**, 883, 1963.
13. Ansell G. B., Morgan A., Biochem. J., **69**, 30P, 1958.
14. Nelson W. L., Barnum G. P., J. Neurochem., **6**, 43, 1960.
15. Fiscus W. G., Schneider W. C., Federat. Proc., **25**, 406, 1966.
16. Четвериков Д. А., 1-й Всесоюз. биохим. съезд, тез. докл., в. 1, 109, 1964.
17. Дворкин В. Я., Четвериков Д. А., Шмелев А. А., Укр. биохим. журн., **37**, 529, 1965.
18. Дворкин В. Я., ДАН СССР, **160**, 728, 1965.
19. Репин И. С., Патол. физиол. и эксперим. терапия, **9**, 41, 1965.
20. Lolley R. N., Samson F. E., Amer. J. Physiol., **202**, 77, 1962.
21. Dawson R. M. C., Biochem. J., **75**, 45, 1960.
22. Webster G. R., Biochim. Biophys. Acta, **44**, 109, 1960.
23. Kennedy E. P., Federat. Proc., **16**, 847, 1957.
24. Rossiter R. J., McMurray W. C., Strickland K. P., Federat. Proc., **16**, 853, 1957.
25. Strickland K. P., Pritchard E. T., Thompson W., Rossiter R. J., Biochem. J., **87**, 128, 1963.
26. Artom C., Lofland H. B., in: Biochemistry of Lipids, ed. by Popjak H., Pergam. Press, **116**, 1960.
27. Bremer J., Greenberg D. M., Biochim. Biophys. Acta, **46**, 205, 1961.
28. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Биохимия, **28**, 246, 1963.
29. Dawson R. M. C., Biochem. J., **61**, 552, 1955.
30. Рубель Л. Н., Иванова Т. Н., ДАН СССР, **165**, 943, 1965.
31. Rapport M. M., Norton W. T., Ann. Rev. Biochem., **31**, 104, 1962.

## ЛИПИДНЫЕ ГРАНУЛЫ ЦИТОПЛАЗМЫ НЕЙРОНОВ В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

И. Н. Улыбина

Лаборатория регуляции метаболизма мозга Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В нервной ткани, весьма богатой липидами, в том числе и фосфолипидами, значительное количество этих веществ входит в состав миелина, который является главным компонентом миелиновой оболочки нервных волокон. Однако липиды, находящиеся в теле нейрона, играют также большую роль в осуществлении функций нервной системы, хотя и иную, чем липиды миелиновой оболочки.

Биохимические исследования, при которых для анализа используются кусочки ткани, дают суммарные данные о содержании и распределении липидов в нервной ткани; даже фракции, получаемые при помощи метода дифференциального центрифугирования нервной ткани объединяют субклеточные частицы, принадлежащие различным типам клеток (нервным, глиальным, соединительнотканным). Несмотря на довольно большое количество работ, посвященных гистохимическому выявлению липидов и, в частности, фосфолипидов, до сих пор не найден метод, который давал бы количественную оценку результатов и был бы достаточно специфичен и чувствителен, чтобы с его помощью можно было выявить только фосфолипиды, локализованные в клетках нервной системы в сравнительно малых количествах. Тем не менее гистохимические исследования липидов нервной ткани и особенно нервных клеток совершенно необходимы для выяснения многих нерешенных еще вопросов нейрологии.

Благодаря особенностям своей структуры — наличию гидрофобных и гидрофильных групп — фосфолипиды входят в виде комплексов с белками и углеводами в состав всех клеточных мембранных структур: пограничных слоев клетки и ядра, мембран и крист митохондрий, эндоплазматической сети, лизосом, и выявляются также как цитоплазматические липидные гранулы (липохондрии).

В настоящее время можно считать доказанным, что обмен фосфолипидов тесно связан с функциональным состоянием нерв-



ной системы. Обмен фосфолипидов существенно изменяется при состояниях возбуждения и торможения нервной системы, при гипотермии и кислородном голодании организма (1—4). Однако гистохимические и морфологические исследования фосфолипидов, как и липидов вообще, при различных функциональных состояниях нервной системы, в том числе и при остром кислородном голодании организма, единичны. Сулкин и Кунц обнаружили в нейронах верхнего шейного ганглия кошки суданфильные гранулы, которые исчезали после раздражения электрическим током преганглионарных волокон в течение трех часов; при этом появлялась диффузная окраска цитоплазмы суданом чёрным В (5). При хронической гипоксии (в течение 42 дней) Н. Сулкин и Д. Сулкин с помощью электронного микроскопа показали увеличение количества сферических мембранных структур в цитоплазме нейронов верхнего шейного ганглия (6). Эти частные сведения еще не позволяют сделать каких-либо выводов об участии фосфолипидсодержащих гранул в реакции нейронов на внешнее воздействие.

Предметом настоящего сообщения являются результаты исследования с помощью гистохимических методов фосфолипидсодержащих структур нейронов в норме, при кислородном голодании организма и после электрического раздражения.

#### Методика

Для создания гипоксических условий, белые крысы весом 200—220 г помещались в барокамеру на 2 часа. В течение 20 мин. давление в барокамере снижалось до 180 мм рт. ст., при этом давление животные находились в барокамере до конца срока. Животные забивались декапитацией или сразу после окончания срока пребывания в барокамере, или через 1, 3 и 7 суток. Исследовался головной мозг, спинной мозг и спинальные ганглии шейного отдела. Параллельно те же участки брали у контрольных крыс.

Влияние длительного электрического раздражения изучалось на мотонейронах передних рогов спинного мозга кошки. У взрослых кошек под наркозом (уретан с хлоралозой) вскрывался спинной мозг и отпрепарованный задний корешок на уровне  $L_7$  или  $S_1$  подвергали раздражению с помощью электродов прямоугольными импульсами с частотой 1 или 100 гц в течение двух минут, затем спинной мозг заливали фиксирующей жидкостью и в таких условиях продолжали раздражение еще 18 минут. Контролем служили кошки, препарированные и фиксированные таким же образом, но без раздражения электрическим током. (Этот раздел работы проводился совместно с О. А. Никитиным).

Фиксация производилась в формалин-кальциевой смеси Бэкера. Ионы кальция, как полагают, препятствуют переходу фосфолипидов из ткани в фиксирующую жидкость. Продолжительность фиксации — от 6 до 24 часов. Гистохимически фосфолипиды выявлялись с помощью методов Бэкера и Эльфмана (7, 8). Более четкие результаты были получены при применении метода Бэкера. В местах локализации фосфолипидов развивалась синяя окраска; для доказательства того, что эта окраска связана с присутствием фосфолипидов, применялась контрольная обработка кусочков ткани холодным и горячим пиридином, который экстрагирует фосфолипиды, но не влияет на окраску других веществ, например, гемоглобина.

## Результаты и обсуждение

Наиболее интенсивное синее окрашивание наблюдается в миелиновых оболочках нервных волокон; осевой цилиндр не окрашен. У контрольных животных в цитоплазме нейронов выявляются липидные гранулы размером 1—2 микрона. Гранулы имеют округлую или неправильную форму и окрашены в синий цвет (рис. 1). Отсутствие окраски этих гранул по методу Бэкера

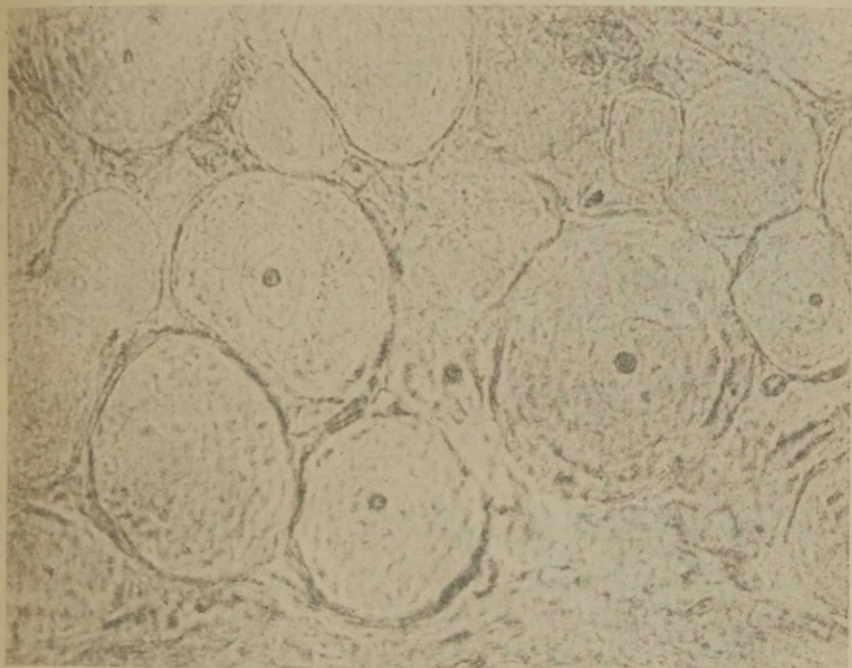


Рис. 1. Липидные гранулы в нейронах спинального ганглия крысы. Норма. Метод Бэкера. Ок. 10, об. 40.

или Эльфмана после предварительной экстракции кусочков ткани пиридином свидетельствует о том, что гранулы содержат значительное количество фосфолипидов (рис. 2). Можно полагать, что эти липидные гранулы аналогичны липохондриям, описанным Бэкером, Кассельманом и др. (9—11). Кроме фосфолипидов гранулы содержат и другие сложные липиды, например, цереброзиды и ганглиозиды (12). О генезе гранул и о связях их с другими клеточными структурами, также как и об их функции, в настоящее время сказать что-либо трудно. Возмож-





Рис. 2. Нейроны спинального ганглия крысы. Экстракция пиридином с последующей окраской по методу Бэкера. Норма. Ок. 10, об. 40.

но, что они представляют собой как бы резерв мембранных структур в клетке (13).

Наиболее четко липидные гранулы выявлены нами в чувствительных нейронах спинальных ганглиев крыс. В этих клетках гранулы равномерно распределены по всей цитоплазме. В передних рогах спинного мозга, продолговатом мозге и в ядрах мозжечка крыс лишь немногие нейроны содержат липидные гранулы и притом в значительно меньшем количестве, чем в спинальном ганглии. В мотонейронах передних рогов спинного мозга контрольных кошек также выявляются липидные гранулы, которые неравномерно распределены в цитоплазме (рис. 3) и обнаруживаются не во всех нейронах передних рогов. Нейроны коры больших полушарий головного мозга и клетки Пуркиньи мозжечка, также как и большинство клеток ствола мозга и спинного мозга не окрашены, цитоплазма их однородна, бледно-желтого цвета и вовсе не содержит липидных гранул. Отдельные нейроны в коре больших полушарий и мозжечка имеют бурый цвет, но контрольная экстракция пиридином не подтверждает наличия в этих клетках фосфолипидов. Вероятно, причиной появления бурой окраски является механическое повреж-



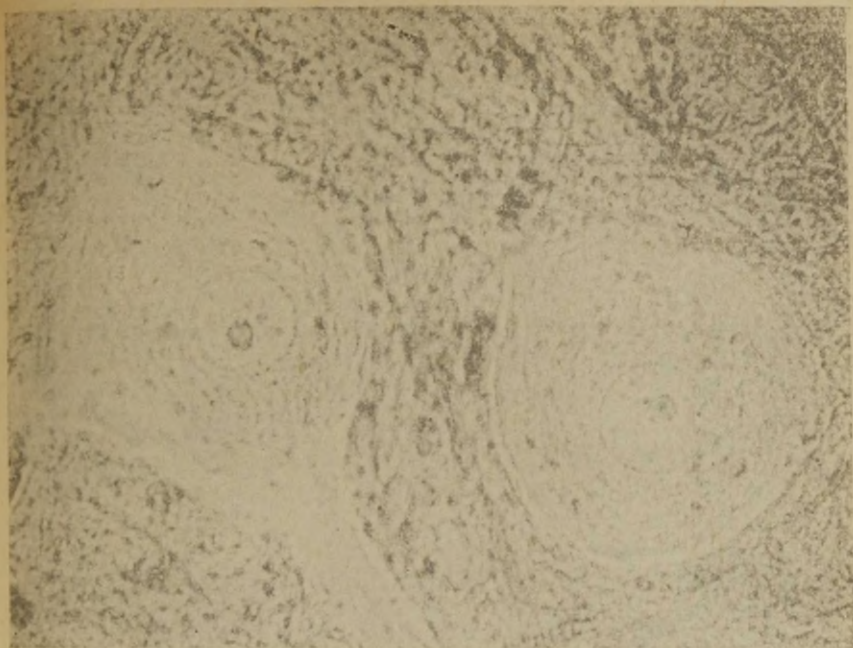


Рис. 3. Липидные гранулы в мотонейронах передних рогов спинного мозга кошки. Норма. Метод Бэкера. Ок. 15, об. 40.

дение этих поверхностно лежащих нейронов (14). Существует также точка зрения, что темная гомогенная окраска нейронов зависит от функционального состояния нейронов (15).

Гипоксия. Острая двухчасовая гипоксия приводит к тому, что в нейронах спинальных ганглиев липидные гранулы обнаруживаются в еще большем количестве клеток, увеличивается количество выявляемых гранул, они интенсивнее окрашиваются и имеют более четкие контуры (рис. 4). Эти изменения обнаруживаются сразу после острого кислородного голодания, но наиболее отчетливо они выражены через 24 часа; через 3 и 7 суток количество и вид гранул не отличается от контроля. В нейронах исследованных отделов центральной нервной системы гипоксия не вызвала видимых изменений изучаемых фосфолипидсодержащих структур.

Анализируя полученные данные, мы применили метод демаскирования липидов с помощью фенола, который вызывает освобождение липидов из липопротеидных комплексов (16). После фиксации в растворе Бэкера спинальные ганглии контрольных крыс помещались на 24 часа в 1% раствор фенола при 37° С; затем производилась обычная обработка по методу Бэкера: хро-

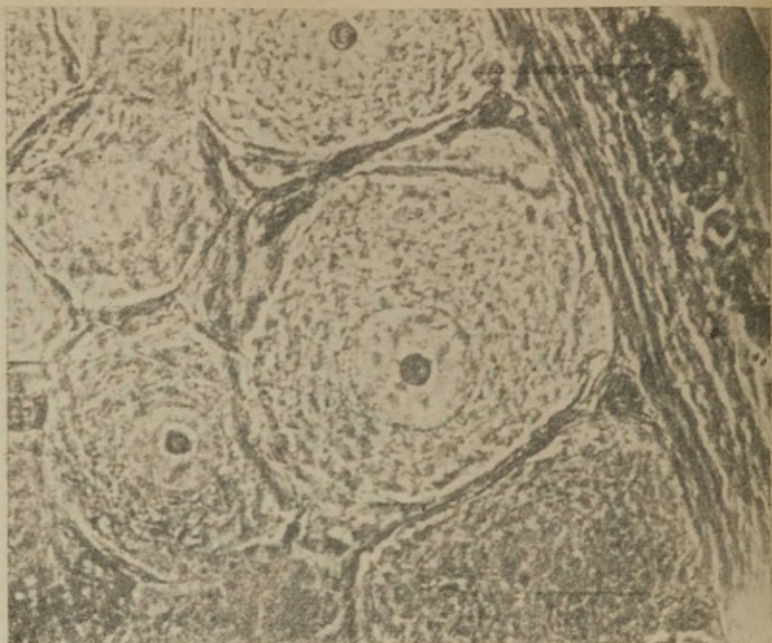


Рис. 4. Липидные гранулы в нейронах спинального ганглия крысы через 24 часа после острой гипоксии. Метод Бэкера. Ок. 15, об. 40.

мирование, окраска кислым гематеином, дифференцирование. Под действием фенола липидные гранулы в цитоплазме нейронов спинального ганглия заметно изменяются, они становятся грубее, сильнее окрашиваются, увеличивается их количество, т. е. появляются изменения того же характера, что обнаружены нами в спинальных нейронах через 24 часа после перенесенной животным острой гипоксии. Сходство этих изменений дает основания предположить, что в результате острого кислородного голодания, аналогично тому, как и после действия фенола, происходит расщепление липопротеидных комплексов с освобождением липидного компонента, который становится более доступным для выявления его с помощью специфических гистохимических методик.

Распад липопротеидных комплексов под влиянием гипоксии представляет собой обратимый процесс, поскольку в более поздние сроки постгипоксического периода (3 и 7 дней) картина нормализуется и не отличается от контрольной.

Электрораздражение. После электрического раздражения заднего корешка спинного мозга кошки импульсами с частотой 1 гц в мотонейронах передних рогов не обнаружено из-



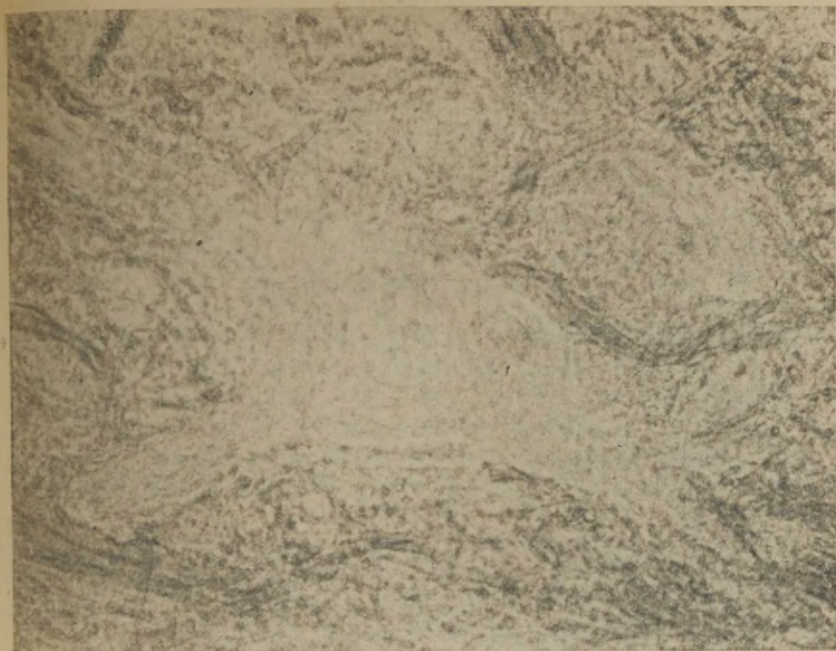


Рис. 5. Липидные гранулы в мотонейронах передних рогов спинного мозга кошки после электрического раздражения импульсами с частотой 100 гц. Метод Бэкера. Ок. 15, об. 40.

менений количества и интенсивности окраски липидных гранул. Раздражение заднего корешка импульсами с частотой 100 гц вызывало явные изменения в количестве и окраске липидных гранул мотонейронов (рис. 5). В этом случае они выявляются в значительно меньшем количестве и окрашиваются менее интенсивно. Различий в этом отношении между ипси- и контралатеральными сторонами спинного мозга не наблюдалось. Изменения более всего были выражены в мотонейронах передних рогов раздражаемого сегмента, слабее в краниальном и каудальном соседних сегментах. Синяя окраска миелиновых оболочек была такой же интенсивной, как и у контрольных животных.

В электрофизиологических экспериментах было показано, что при большой частоте раздражения задних корешков можно наблюдать затухание биопотенциалов — наступает блок проведения в центральном участке рефлекторной дуги (17). В этих экспериментальных условиях гистологическими и гистохимическими методами были обнаружены хроматоллиз субстанции Ниссля (18) и увеличение количества сульфгидрильных групп. Эти данные и показанное нами уменьшение количества и снижение



окрашиваемости липидных гранул в мотонейронах раздражаемого сегмента спинного мозга свидетельствуют о дезинтеграции некоторых внутриклеточных структур нейрона. Предполагают, что в цитоплазме нейронов существуют сложные комплексные образования, в состав которых входят рибонуклеиновая кислота, белок, фосфолипиды и, возможно, другие вещества (19). Можно думать, что для нормального проведения нервного импульса необходима структурная целостность этих образований. При состоянии блока проведения в наших экспериментальных условиях имеет место их дезинтеграция, наступает распад этих комплексных структур на отдельные компоненты. Снижение окраски, полученное гистохимическими методами на фосфолипиды, показывает, что дезинтеграция комплексов не приводит к разрыву связей фосфолипидов с белком и к их освобождению, так как в противном случае окраска была бы более интенсивной. Вероятно, эти комплексы расщепляются на имеющие меньший размер компоненты, что приводит к менее отчетливому выявлению их гистохимическими методами.

Результаты проведенной работы показывают, что кислородное голодание и электрическое раздражение вызывают характерные для каждого из этих видов воздействия изменения в липидных гранулах нейронов исследованных структур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dawson R. M. C., Richter D., Proc. Roy. Soc., Ser. B, 137, 252, 1950.
2. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Рубель Л. Н., Тр. Инст. физиол. им. И. П. Павлова АН СССР, 5, 409, 1956.
3. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Правдина Н. И., Рубель Л. Н., Биохимия, 24, 891, 1959.
4. Крепс Е. М., Смирнов А. А., Четвериков Д. А., В сб.: Биохимия нервной системы, Киев, 125, 1954.
5. Sulkin N. M., Kuntz A., Anat. Record, 108, 255, 1950.
6. Sulkin N. M., Sulkin D. F., J. Labor. Investig., 14, 1523, 1965.
7. Baker J. R., Quart. Jour. Micr. Sci., 87, 441, 1946.
8. Elftman H., J. Histochem. Cytochem., 2, 1, 1954.
9. Casselman W. G. B., Baker J. R., Quart. J. Micr. Sci., 96, 49, 1955.
10. Shafiq S. A., Casselman W. G. B., Quart. J. Micr. Sci., 95, 315, 1954.
11. Young J. Z., Endeavour, XV, 57, 5, 1956.
12. Koenig H., Nature, 195, 4843, 782, 1962.
13. Мерсер Э., В сб.: Ультраструктура и функция клетки, Москва, 212, 1965.
14. Brodal A., Harrison R. G., Quart. J. Micr. Sci., 89, 89, 1948.
15. Lange W., Acta Histochem., 23, 31, 1966.
16. Gupta B. L., Nature, 181, 4608, 555, 1958.
17. Базанова И. С., Меркулова О. С., Черниговский В. Н., Тр. Инст. физиол. им. И. П. Павлова АН СССР, 11, 20, 1965.
18. Базанова И. С., Ионтов А. С., Меркулова О. С., В сб.: Морфология путей и связей ЦНС. Изд. «Наука», 19, 1965.
19. Preto Parvis V., Bosisio M. R., Acta Histochem., 10, 210, 1960.

## ИЗУЧЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НЕКОТОРЫХ ФРАКЦИЙ ЛИПИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Г. П. Соколова, Л. А. Золотова

Лаборатория биохимии нервной системы и обмена веществ Физиологического института им. Ухтомского Ленинградского государственного университета, Ленинград

Жирные кислоты головного мозга до сих пор остаются одним из наименее изученных компонентов липидов. Между тем на их долю приходится около 40% веса всех липидов нервной ткани, и они в значительной степени определяют многообразие этих веществ. Известно, что жирные кислоты в мозговой ткани представлены очень широко. Бейкеру (1), например, удалось установить в этом органе наличие более 20 различных кислот, причем значительную часть из них составляют полиненасыщенные жирные кислоты.

Количественное и качественное разнообразие жирных кислот и в то же время многие черты сходства в их строении и свойствах чрезвычайно затрудняют исследование этих веществ. Этим можно объяснить тот факт, что в литературе имеется сравнительно мало сведений о составе и содержании отдельных жирных кислот в различных липидах мозга. Применение метода газовой хроматографии позволяет значительно расширить и уточнить данные о жирнокислотном составе липидных фракций. Однако работы, посвященные изучению жирных кислот различных липидов мозга, и, в частности, фосфолипидов, еще очень немногочисленны (2—8).

Согласно имеющимся данным, отдельные представители фосфолипидов значительно отличаются друг от друга по составу входящих в них жирных кислот (2, 3). Однако следует отметить, что исследования жирнокислотного состава индивидуальных фосфолипидов разными авторами не дали вполне совпадающих результатов (2, 3, 4). Объясняются ли эти расхождения непостоянством состава изучаемых липидов или же причинами методического характера — сказать пока трудно. Но уже сейчас ясно, что состав жирных кислот в отдельных фракциях фос-

фолипидов гораздо более сложен и разнообразен, чем это считалось ранее.

Относительно интенсивности обмена отдельных жирных кислот и их функциональной роли данных еще меньше, а имеющиеся работы касаются главным образом пальмитиновой и стеариновой кислот (9, 10).

Из сказанного выше вытекает необходимость дальнейшего изучения жирных кислот липидных фракций головного мозга.

Опыт исследования жирных кислот показывает, что для этой цели наиболее перспективным является комплексное применение различных методов — тонкослойной, бумажной, газовой хроматографии в сочетании с методом радиоактивных изотопов. Одновременное использование этих методов дает возможность выделить в чистом виде отдельные фракции липидов тканей, исследовать состав и содержание в них жирных кислот и, наконец, получить препаративно чистые жирные кислоты, что необходимо в случае изучения интенсивности их обмена с помощью изотопов.

Настоящая работа является попыткой исследовать жирно-кислотный состав некоторых фосфолипидов мозга: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, сфингомиелина и др.

Изучалась также интенсивность обмена фракции свободных жирных кислот головного мозга. Это представляет интерес в связи с тем, что свободные жирные кислоты, возможно, являются предшественниками жирных кислот других фракций липидов мозга (11).

### Методика

Фракции свободных жирных кислот и общих фосфолипидов мозга выделялись с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках с препаративным слоем силикагеля марки «КСК». Разделение липидов производилось в системе гексан — диэтиловый эфир — уксусная кислота (70 : 30 : 2) (12), а также в системе эфир-бензол-этанол-уксусная кислота (40 : 50 : 2 : 0,2), а затем — гексан-эфир (94 : 6) (13). При этом фосфолипиды остаются на старте, а свободные жирные кислоты дают при проявлении йодом резко выраженное пятно с  $R_f = (0,41-0,45)$  в первой системе и  $(0,21-0,25)$  во второй. Идентификация пятна жирных кислот производилась с помощью стандартов.

Фосфолипиды разделялись на фракции также с помощью тонкослойной хроматографии. При использовании системы хлороформ-метанол-аммиак (12 : 7 : 1) (14) было получено шесть фосфорсодержащих фракций с  $R_f = 0,069; 0,187; 0,237; 0,403; 0,597; 0,772$ . По данным А. А. Липской (15), вторая фракция, начиная от старта, представляет собой фосфатидилсерин, третья — сфингомиелин, четвертая — фосфатидилхолин, пятая — фосфатидилэтаноламин. Первую и шестую фракции идентифицировать не удалось.

Полученные фракции экстрагировались из силикагеля и подвергались газовой-хроматографическому анализу.

Газо-жидкостная хроматография осуществлялась на чехословацком хро-



хроматографе «Хром-2» с пламенно-ионизационным детектором при следующих условиях: длина колонки — 1,6 м; жидкая фаза — полиэтиленгликольсукцинат, 15% на целите 545; газ-носитель — азот; скорость газа-носителя — 30 мл/мин; температура колонки — 201°С; чувствительность — 1/200. Жирные кислоты анализировались в виде метиловых эфиров. Метилирование производилось по методу Пейскера (16).

Исследовались также количество и интенсивность обмена фракции свободных жирных кислот. Количество жирных кислот определялось по методу Айерса (17) и Дюнкомба (18). Интенсивность обмена свободных жирных кислот изучалась с помощью меченого углерода  $C^{14}$ , который вводился крысам подкожно в виде 2- $C^{14}$ -ацетата. Доза ацетата — 30 мккюри на 100 г веса.

## Результаты исследований

Количественное определение жирных кислот показало, что в мозгу содержится около 160 мкМ свободных жирных кислот в 100 г ткани или в пересчете на стеариновую кислоту — 45—50 мг% жирных кислот на сырой вес ткани.

Результаты опытов по определению радиоактивности фракции свободных жирных кислот, извлеченной из тонкослойной хроматограммы, представлены в таблице 1. В постановке этой серии опытов принимала участие Г. Г. Кузнецова.

Таблица 1

Удельная активность свободных жирных кислот и общих липидов мозга

№№ опыта	Продолжит. экспозиции	Удельн. активность жирных кислот (имп/мин · мг стеариновой к-ты)	Удельн. активность общих липидов (имп/мин · мг)
1	10 мин.	158	27
2	„	130	23
3	„	162	23
4	„	148	24
5	„	232	22
6	„	288	15
7	„	260	38
8	„	288	—
9	„	331	25
10	„	423	41
11	„	366	28
Среднее		$253 \pm 28$	$27 \pm 2$
12	30 мин.	370	74
13	„	416	99
14	„	447	82
15	„	645	93
Среднее		$469 \pm 60$	$87 \pm 6$

№№ опыта	Продолжит. экспозиции	Удельн. активность жирных кислот (имп/мин · мг стеари- новой к-ты)	Удельн. активность общих липидов (имп/мин · мг)
16	2 часа	176	34
17	„	366	42
18	„	267	23
19	„	468	40
Среднее		$320 \pm 63$	$35 \pm 4$

Из таблицы 1 видно, что интенсивность обмена свободных жирных кислот мозга довольно высока. Их удельная активность в 6—10 раз превышает удельную активность общих липидов мозговой ткани. Наши предварительные данные по интенсивности обмена отдельных жирных кислот этой фракции, выделенных с помощью бумажной хроматографии (19), показали, что наибольшая радиоактивность приходится на долю пальмитиновой и стеариновой кислот.

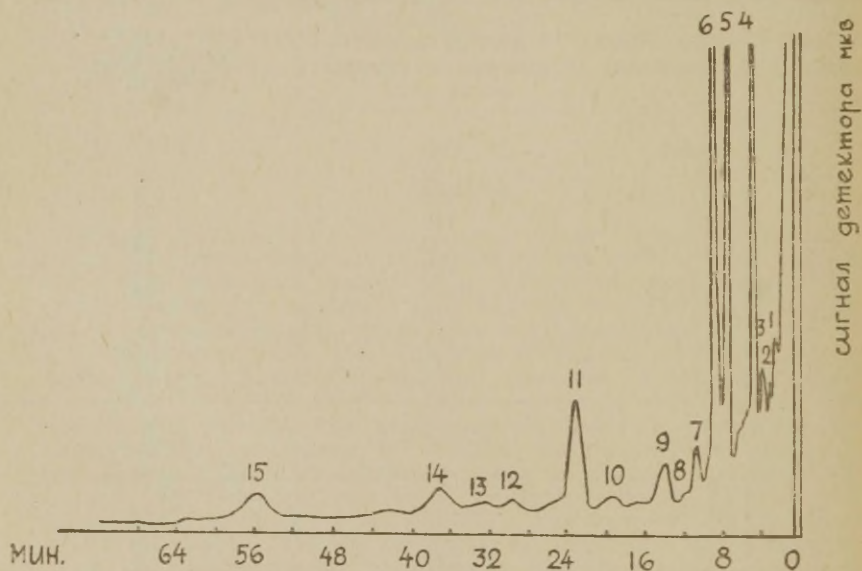


Рис. 1. Газовая хроматограмма жирных кислот общих фосфолипидов мозга.

1 — ?; 2 — 14:0; 3 — ?; 4 — 16:0 (чувств. 1/500); 5 — 18:0 (чувствительность — 1/500); 6 — 18:1 (чувств. 1/500); 7 — 18:2; 8 — 20:0; 9 — 18:3; 10 — ?; 11 — 20:4; 12 — ?; 13 — 24:0; 14 — ?; 15 — 26:0 ?.

В следующей серии опытов изучался состав жирных кислот общей фракции фосфолипидов и их отдельных представителей (фосфатидилсерина, сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др.).

Анализ общих фосфолипидов показал (рис. 1), что в целом эти вещества особенно богаты стеариновой, олеиновой и пальмитиновой кислотами, на долю которых приходится более 60% от содержания всех жирных кислот. Далее следует арахидоновая кислота, составляющая около 10%. Всего в этой фракции обнаружено 15 кислот, содержащихся в количестве от 0,5 до 22%.

Таблица 2

Состав и содержание жирных кислот во фракциях фосфолипидов головного мозга

Время удерживания	Количество атомов углерода и двойных связей в кислоте	Фракции фосфолипидов *					
		I	II	III	IV	V	VI
2' 5"	12 : 0	0,2	—	—	—	—	—
2'35"	x	0,5	1,1	2,2	0,4	1,0	2,3
3'10"	14 : 0	0,8	2,5	3,9	0,8	1,0	5,2
4'00"	x	2,3	3,4	5,8	1,3	2,7	7,3
4'40"	x	—	—	—	—	1,6	—
5'10"	16 : 0	8,0	10,8	10,3	33,7	7,0	9,6
6'30"	16 : 1	3,1	4,4	6,2	2,9	2,6	8,5
8'00"	18 : 0	38,0	34,6	34,3	17,2	16,1	3,6
8'25"	x	—	—	—	—	—	8,0
9'20"	18 : 1	14,6	8,0	6,6	28,9	13,2	4,1
11'15"	18 : 2	1,5	4,1	6,4	3,5	1,8	7,4
12'00"	x	6,4	—	—	—	—	—
13'00"	20 : 0	—	2,1	1,4	—	—	0,8
14'40"	18 : 3	3,9	5,0	4,9	2,5	3,1	6,1
19'20"	x	2,2	5,3	3,0	1,0	2,5	5,6
21'00"	x	—	—	—	—	17,7	1,8
24'40"	22 : 0	—	—	—	—	—	1,8
26'00"	20 : 4	4,7	14,8	3,7	3,5	9,9	6,7
32'00"	x	—	—	—	—	3,6	2,5
34'30"	24 : 0	3,7	3,8	6,9	1,0	2,5	7,7
39'00"	x	2,6	—	4,4	1,2	4,2	6,1
47'00"	x	3,1	—	—	1,2	3,0	1,9
61'00"	26 : 0?	4,5	—	—	0,7	6,4	2,5

x — неидентифицированные кислоты.

\* — I фракция фосфолипидов — не идентифицирована.  
 II " " — фосфатидилсерин.  
 III " " — сфингомиелин.  
 IV " " — фосфатидилхолин.  
 V " " — фосфатидилэтаноламин.  
 VI " " — не идентифицирована.



Рис. 2. Газовая хроматограмма жирных кислот 1-й фракции фосфолипидов мозга.

1 — 12:0; 2 — ?; 3 — 14:0; 4 — ?; 5 — 16:0; 6 — 16:1; 7 — 18:0 (чувствит. 1/500); 8 — 18:1; 9 — 18:2 + ?; 10 — 18:3; 11 — ?; 12 — 20:4; 13 — ?; 14 — 24:0; 15 — ?; 16 — ?; 17 — 26:0 ?.

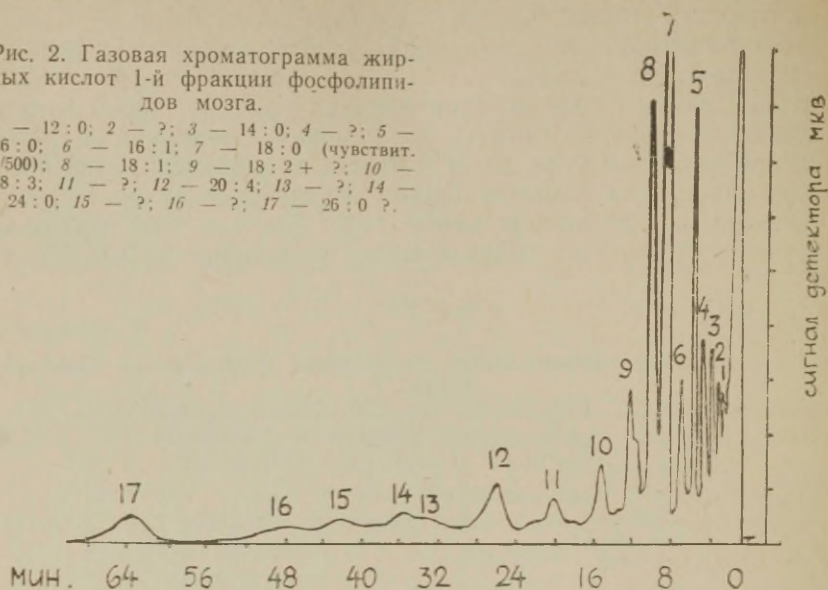


Рис. 3. Газовая хроматограмма жирных кислот фосфатидилсерина мозга.

1 — ?; 2 — 14:0; 3 — ?; 4 — 16:0; 5 — 16:1; 6 — 18:0; 7 — 18:1; 8 — 18:2; 9 — 20:0; 10 — 18:3; 11 — ?; 12 — 20:4; 13 — 24:0.

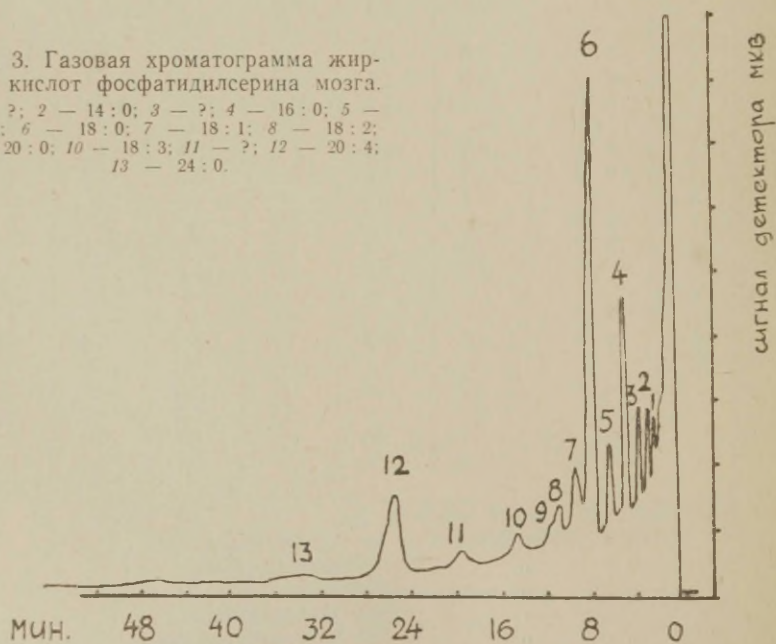


Рис. 4. Газовая хроматограмма жирных кислот сфингомиелина мозга.

1 — ?; 2 — 14:0; 3 — ?; 4 — 16:0;  
5 — 16:1; 6 — 18:0; 7 — 18:1; 8 —  
18:2; 9 — 20:0; 10 — 18:3; 11 — ?;  
12 — 20:4; 13 — 24:0; 14 — 24:1 ?

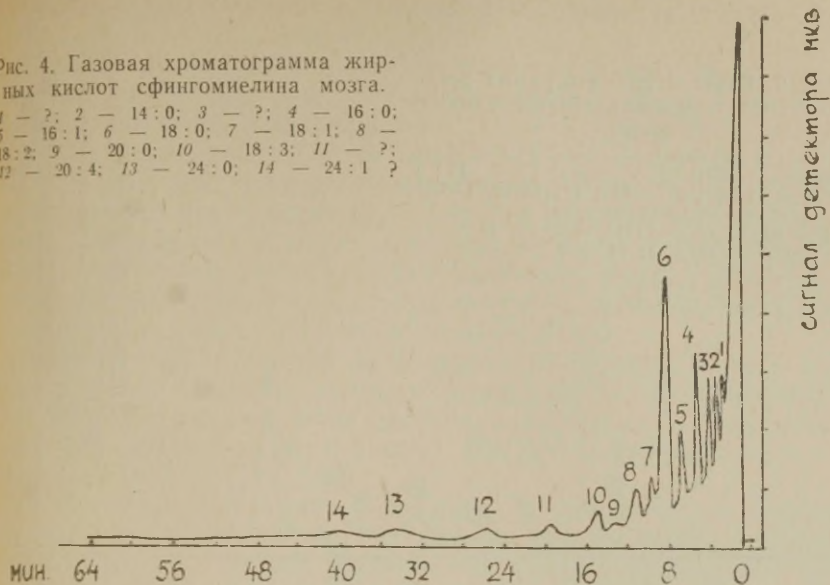


Рис. 5. Газовая хроматограмма жирных кислот фосфатидилхолина мозга.

1 — ?; 2 — 14:0; 3 — ?; 4 — 16:0  
(чувств. 1/5000); 5 — 16:1; 6 — 18:0  
(чувств. 1/500); 7 — 18:1 (чувств. 1/1000);  
8 — 18:2; 9 — 18:3; 10 — ?; 11 — 20:4;  
12 — 24:0; 13 — ?; 14 — ?; 15 — 26:0?

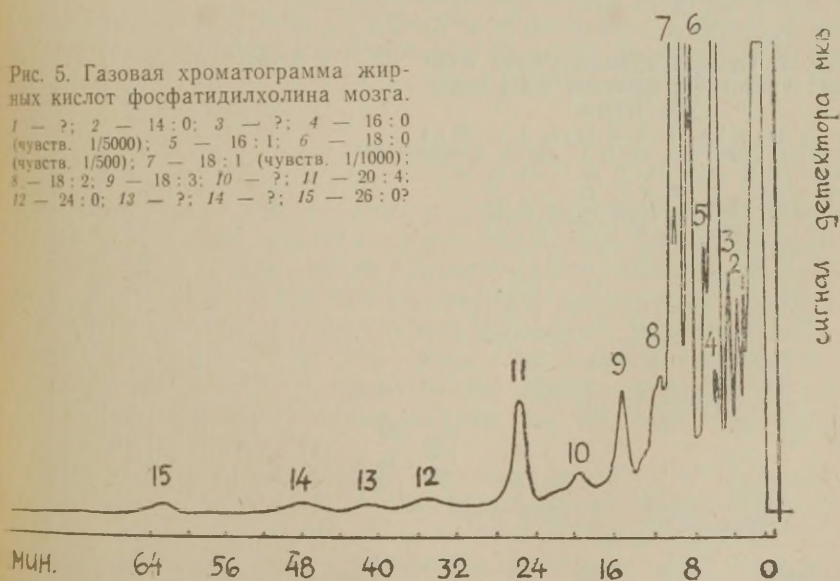


Рис. 6. Газовая хроматограмма жирных кислот фосфатидилэтаноламина мозга.

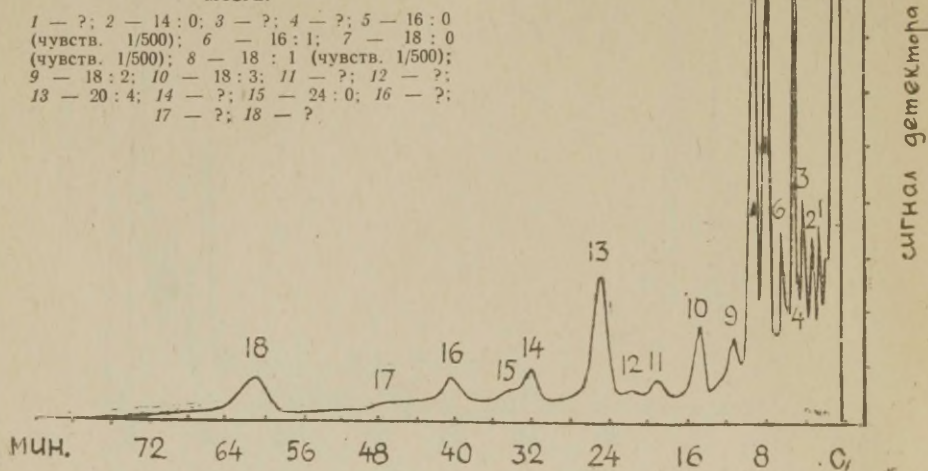
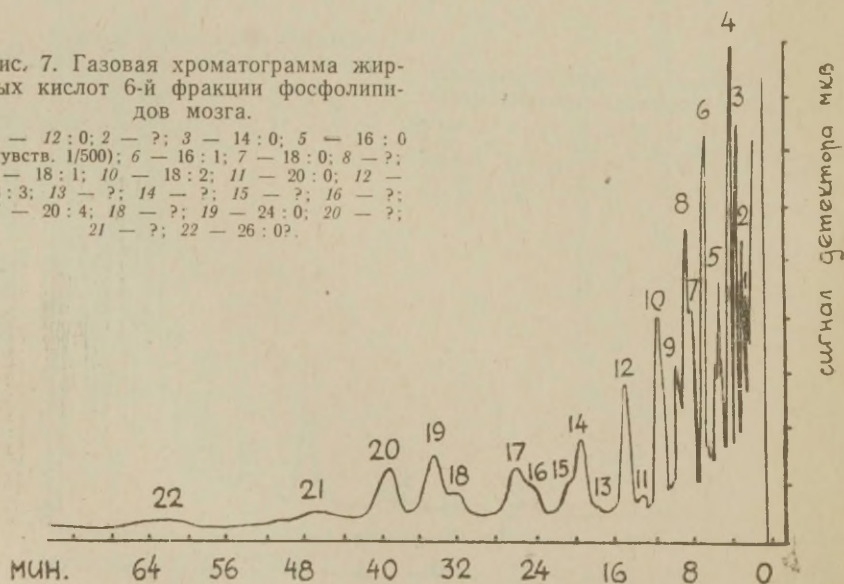


Рис. 7. Газовая хроматограмма жирных кислот 6-й фракции фосфолипидов мозга.

1 — 12:0; 2 — ?; 3 — 14:0; 5 — 16:0 (чувств. 1/500); 6 — 16:1; 7 — 18:0; 8 — ?; 9 — 18:1; 10 — 18:2; 11 — 20:0; 12 — 18:3; 13 — ?; 14 — ?; 15 — ?; 16 — ?; 17 — 20:4; 18 — ?; 19 — 24:0; 20 — ?; 21 — ?; 22 — 26:0?





При анализе отдельных фракций фосфолипидов обнаружено следующее (см. табл. 2 и рис. 2—7).

Первые три фракции, в том числе фосфатидилсерин и сфингомиелин (2-я и 3-я фракции), отличаются наиболее высоким содержанием стеариновой кислоты, которая составляет в них 35—38% от суммарного содержания всех жирных кислот. В первой и второй фракциях фосфолипидов наблюдается также высокий процент ненасыщенных кислот — олеиновой и арахидиновой. На третьем месте по содержанию стоит пальмитиновая кислота. В третьей фракции (сфингомиелин), наряду со стеариновой и пальмитиновой кислотами, отмечено сравнительно высокое содержание лигноцериновой кислоты (7%).

Четвертая фракция фосфолипидов (фосфатидилхолин) характеризуется особенно высоким содержанием пальмитиновой кислоты (34%). Далее идет олеиновая кислота, составляющая около 30% от суммы всех кислот. На долю стеариновой кислоты здесь приходится 17%.

В пятой (фосфатидилэтаноламин) и, особенно, в шестой фракциях фосфолипидов не отмечено резких различий в содержании отдельных кислот. Жирные кислоты распределены здесь более или менее равномерно. В фосфатидилэтаноламине несколько преобладают неидентифицированная кислота (по-видимому, докозеновая) и стеариновая.

Таким образом, различные фракции фосфолипидов отличаются друг от друга по составу входящих в них жирных кислот. В отдельных фосфолипидах обнаруживается от 15 до 22 жирных кислот, содержащихся в количестве от 0,4 до 38% (табл. 2).

### Выводы

Изучалась скорость включения радиоактивного ацетата во фракцию свободных жирных кислот головного мозга, выделенную с помощью тонкослойной хроматографии. Обнаружено, что интенсивность обмена свободных жирных кислот мозга довольно высока. Удельная активность этой фракции в расчете на стеариновую кислоту в 6—10 раз превышает удельную активность общих липидов мозга. Радиоактивный изотоп обнаруживается во фракции свободных жирных кислот уже через 10 мин. после его введения.

Исследовался также состав жирных кислот во фракциях фосфолипидов, полученных с помощью тонкослойной хроматографии.

Во фракции общих фосфолипидов обнаружено 15 жирных кислот, причем на долю стеариновой, олеиновой и пальмитиновой кислот приходится более 60% от общего содержания кислот.

В отдельных фракциях фосфолипидов обнаружено от 13 до

20 различных жирных кислот, содержащихся в количестве от 0,2 до 38% от общего содержания жирных кислот. Фосфатидил-холин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин, фосфатидилсерин значительно отличаются друг от друга по составу жирных кислот.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Baker R. W. R., *Biochem. J.*, **79**, 642, 1961.
2. O'Brien J. S., Sampson E. L., *J. Lipid. Res.*, **6**, 537, 1965.
3. Stallberg-Stenhagen, S., Svennerholm L., *J. Lipid. Res.*, **6**, 146, 1965.
4. Бернсон, Абуд (Bernsohn J., Abood L. G.), V Междунар. биохим. конгресс. Рефераты секцион. сообщ., т. II, стр. 521, 1961.
5. Klenk E. G., Gielen W., *Z. physiol. Chem.*, **326**, 144, 1961.
6. Rosenberg A., Stern N., *J. Lipid. Res.*, **7**, 122, 1966.
7. O'Brien J. S., Fillerup D. L., Mead J. F., *J. Lipid. Res.*, **5**, 109, 1964.
8. Saifer A., Robin M., Volk B. W., *J. Neurochem.*, **10**, 577, 1963.
9. Kishimoto Y., Davies W. E., Radin N. S., *J. Lipid. Res.*, **6**, 525, 1965.
10. Bernard K., Hany A., Hausheer L., Pedersen W., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1786, 1962.
11. Dole V. P., *J. Clin. Invest.*, **35**, 150, 1956.
12. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Изд. ЛГУ, 1965.
13. Freeman C. P., West D., *J. Lipid. Res.*, **7**, 324, 1966.
14. Skidmore W. D., Entenman C., *J. Lipid. Res.*, **3**, 356, 1962.
15. Липская А. А., Интенсивность обмена отдельных фракций фосфолипидов мозга. Автореферат канд. дисс. Изд. ЛГУ, 1966.
16. Peisker K. V., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 87, 1964.
17. Ayers J., *Anal. Chem. Acta*, **15**, 77, 1964.
18. Duncombe W. G., *Biochem. J.*, **88**, 7, 1963.
19. Соколова Г. П., Кузнецова Г. Г., Золотова Л. А., Сб.: Нервная система, № 7, 1966.

# ФОСФОЛИПИДЫ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗНЫХ КЛАССОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

Е. М. Крепс, В. И. Красильникова, М. В. Патрикеева, А. А. Смирнов,  
Е. В. Чирковская, Е. Ю. Ченыкаева

Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

В работе, посвященной изучению фосфолипидов нервной системы в эволюционном ряду животных и опубликованной в 1963 году (1), исследовались только гомогенаты нервной системы. Было показано, что общая картина фосфолипидного со-

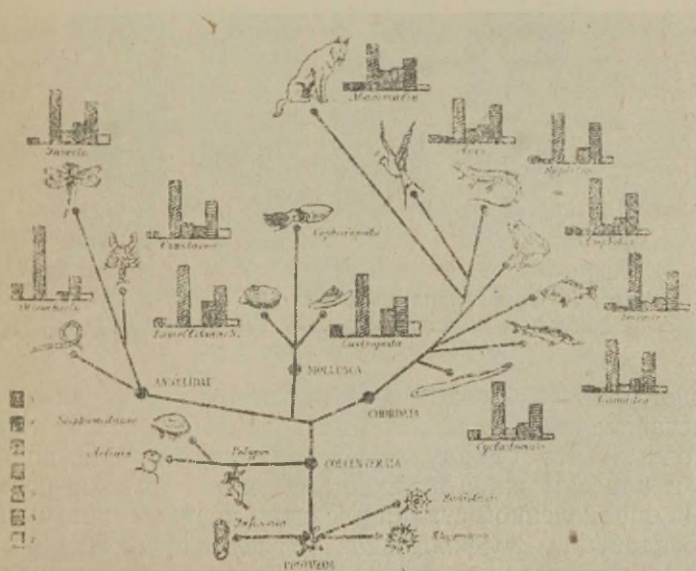


Рис. 1. Фосфолипиды гомогенатов центральной нервной системы в эволюционном ряду животных. % Р к суммарному фосфору липидов.

1 — монофосфоинозитид; 2 — х-липид; 3 — лецитин; 4 — сфингомиелин; 5 — фосфатидилсерин; 6 — фосфатидилэтаноламин; 7 — кардиолипин.



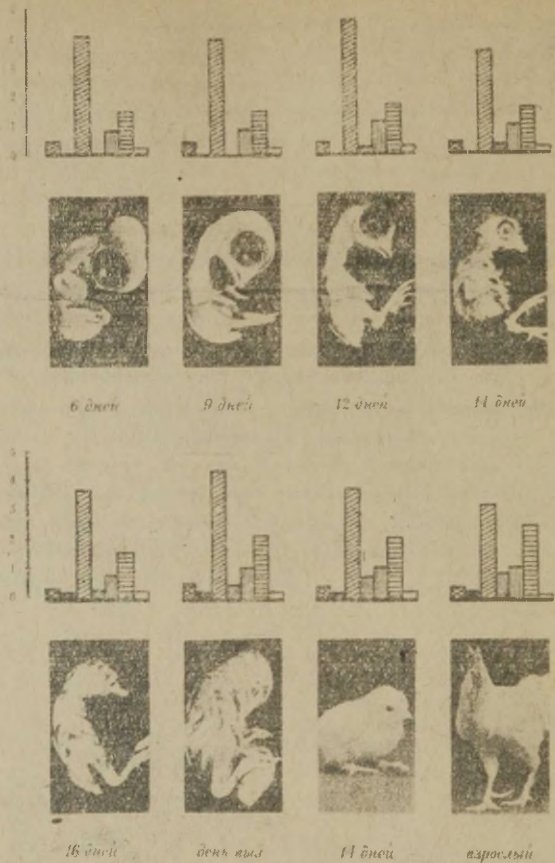


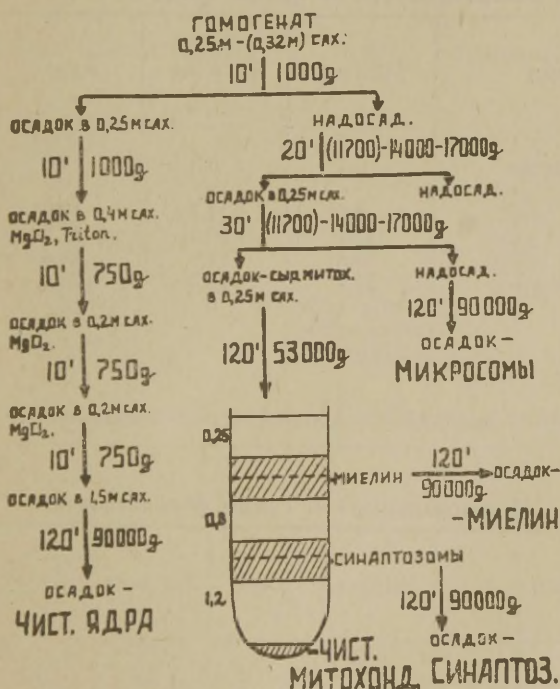
Рис. 2: Фосфолипиды гомогенатов мозга в эмбриональном развитии куры. мг Р/г сухого веса.  
Обозначения те же, что к рис. 1.

става центральной нервной системы построена по единому плану у представителей всех классов позвоночных и у всех типов беспозвоночных; что наряду с фосфолипидами, присущими всем типам и классам животных, есть и такие, которые появляются лишь на определенной стадии развития нервной системы (рис. 1).

Исследования фосфолипидов в гомогенатах и в различных субклеточных частицах у развивающегося куриного эмбриона (рис. 2) позволили сделать два вывода: во-первых, биохимическое развитие центральной нервной системы в онтогенезе во всех существенных чертах повторяет филогенетическое развитие, т.е. биогенетический закон рекапитуляции, выдвинутый Э. Геккелем, находит полное подтверждение в биохимическом материале; и, во-вторых, такие клеточные образования, как ядра,

митохондрии, микросомы, миелиновые структуры по своему фосфолипидному составу имеют и черты сходства, и существенные отличия (2). Это позволяло строить предположения о возможной физиологической роли отдельных фосфолипидов. С другой стороны, подтверждение получила мысль), что все фосфолипиды полифункциональны.

В настоящем сообщении представлен новый сравнительный материал по изучению фосфолипидов субклеточных фракций нервной системы у представителей разных классов позвоночных, полученных с более совершенной техникой разделения. Это позволяет с большей уверенностью делать некоторые выводы.



Цифры в скобках относятся к опытам на теплокровных животных (кура, крыса). без скобок — на холодокровных животных (минога, рыба, лягушка).

гласно схеме (рис. 3), которая близка описанной Эйхберг и сотр. (3). Детали техники (концентрации раствора сахарозы, сроки и скорости вращения) приходилось варьировать, подбирая оптимальные условия для лучшего разделения фракций, получаемых из ЦНС низших (круглоротые, рыбы, амфибии, рептилии) и высших позвоночных (птицы, млекопитающие). Это связано с отличиями в плотности (удельном весе) субклеточных частиц и с большей или меньшей осмотической резистентностью мембран, которые требовалось разрывать, например, наружные мембраны «синапсосом».

В таблицах 1, 2, 3, 4, 5 представлены данные по относительному содержанию фосфора фосфолипидов в разных частях клеток головного мозга — ядрах, митохондриях, микросомах, «синаптозомах» и миелиновых структурах — у животных, относящихся к разным классам позвоночных. Из этих частиц только ядра и митохондрии являются клеточными органеллами,

Таблица 1

Микросомы (% от суммы фосфолипидов)

Фосфолипид	Минога	Лягушка	Кура	Морская свинка (Eichberg et al.)
Монофосфоинозитид	9,1	8,3	4,0	4,8
х-липид *	—	+	+	—
Сфингомиелин	4,8	4,7	10,0	7,5
Лецитин	47,4	56,5	47,5	41,4
Серинфосфатид	15,8	11,9	13,4	11,9
Этаноламинфосфатид	21,8	18,5	25,1	27,8
Кардиолипин	Следы (примесь митохондрий)	0	0	Следы

\* Как недавно обнаружено, х-липид является сульфocereброзидом.

Таблица 2

Митохондрии (% от суммы фосфолипидов)

Фосфолипид	Минога	Карп	Лягушка	Кура	Морская свинка (Eichberg et al.)
Монофосфоинозитид	5,8	3,8	5,8	5,1	5,5
х-липид	—	+	—	+	—
Сфингомиелин	6,5	Следы	4,0	8,3	3,7
Лецитин	40,5	46,6	45,8	38,1	40,0
Серинфосфатид	12,4	11,6	7,1	14,5	5,9
Этаноламинфосфатид	29,8	30,9	31,0	31,6	32,7
Кардиолипин	3,9	7,1	6,3	2,4	11,0



Таблица 3

## Ядра (% от суммы фосфолипидов)

Фосфолипид	Карп	Лягушка	Кура	Морская свинка (Eichberg et al.)
Монофосфоинозитид	6,3	9,5	5,0	2,6
х-липид	+	+	1,9	—
Сфингомиелин	5,0	8,9	7,7	7,1
Лецитин	48,9	45,9	35,7	33,6
Серинфосфатид	11,4	9,5	13,3	11,1
Этаноламинфосфатид	24,9	25,9	32,0	31,4
Кардиолипин	3,5	0,3	6,3	2,3

Таблица 4

## «Синапсомы (% от суммы фосфолипидов)

Фосфолипид	Миного	Карп	Лягушка	Морская свинка (Eichberg et al.)
Монофосфоинозитид	5,4	4,0	8,9	4,0
х-липид	—	+	+	—
Сфингомиелин	7,1	—	4,3	5,3
Лецитин	44,2	47,8	52,4	39,3
Серинфосфатид	15,8	14,8	12,4	12,9
Этаноламинфосфатид	26,4	29,1	21,1	33,6
Кардиолипин	1,1	4,3	0,9	1,6

Таблица 5

## Миелин (% от суммы фосфолипидов)

Фосфолипид	Карп	Лягушка	Кура	Морская свинка (Eichberg et al.)
Монофосфоинозитид	8,1	7,6	3,2	2,9
х-липид	+	+	+	—
Сфингомиелин	8,6	7,4	15,0	7,3
Лецитин	43,0	52,3	23,5	32,7
Серинфосфатид	10,7	9,7	22,5	14,1
Этаноламинфосфатид	24,9	23,0	35,8	38,0
Кардиолипин	2,1 *	0	0	0

\* Положительная реакция на сукцинатдегидрогеназу указывает на примесь митохондрий, что объясняет наличие кардиолипина.

существующими в интактной клетке. Микросомы — это обрывки эндоплазматического ретикулума, «синапсомы» — это оторванные нервные окончания с заключенными внутри наружной мембраны синаптическими пузырьками, а миелиновая фракция — это оторванные спиральные обрывки миелиновых оболочек нервных стволов. Для сравнения в таблицах приводятся данные по изучению субклеточных фракций мозга морской свинки из работы Eichberg et al. (3).

Биохимическое исследование сопровождалось, как правило, исследованием фракций в электронном микроскопе для оценки степени однородности (чистоты) полученной фракций и проверкой на ферментную активность сукцинатдегидрогеназы для оценки в данной фракции примесей митохондрий.

В каждой таблице представлено по несколько видов животных, принадлежащих к разным классам позвоночных: животных водных, наземных и переходных (амфибий), животных с разной экологией и разными типами питания.

Рассмотрение и сопоставление этих таблиц показывает, что первые общие выводы, которые были сделаны на основании изучения гомогенатов ЦНС разных животных и сравнительного изучения разных субклеточных частиц мозга куры (2,4), остаются в силе: 1) сходство фосфолипидного набора (phospholipid pattern) центральной нервной системы разных видов животных и 2) известные общие черты, объединяющие разные субклеточные частицы.

Эти общие черты, объединяющие разные субклеточные фракции, состоят в том, что лецитин, а за ним фосфатидилэтаноламин, везде выступают как самые массивные фосфолипиды; за ними следует присутствующий также везде фосфатидилсерин. Во всех субклеточных фракциях в небольшой концентрации, но обязательно, есть монофосфоинозитид; в больших или меньших количествах, но есть также сфингомиелин.

Постоянны только эти пять фосфолипидов. Остальные — кардиолипин (полиглицерофосфатиды), фосфатидная кислота — не постоянны, т. е. есть субклеточные фракции, где они могут отсутствовать. Пять «постоянных членов» не только всегда обнаруживаются, но их относительная концентрация остается везде очень близкой. Эти пять фосфолипидов содержатся во всех клеточных мембранах и в виде белково-липидных комплексов входят в состав различных ферментных систем митохондрий, ядер и других клеточных частиц.

Возникает несколько вопросов. Первый — как понимать такое биохимическое сходство у представителей таких далеко не близких родственников, как отдельные классы позвоночных? По-видимому, надо понимать дело так, что основной «набор» фосфолипидов, из которых строятся биологические мембраны, как и

сама структура мембран, сложился рано в эволюции животного мира и закрепился генетически.

Среди биохимических характеристик клетки есть свойства, которые находятся под несомненным строгим генетическим контролем, есть другие свойства, которые зависят прежде всего от условий существования, и, наконец, третьи, которые зависят от обоих этих факторов.

В сложной молекуле фосфолипидов, особенно фосфолипидов нервной системы, все ее составляющие части строго детерминированы качественно и количественно. Наиболее вариabильным ее элементом является жирнокислотный состав фосфолипидов, который, по-видимому, несет на себе влияние и генетического контроля, и условий среды, питания, температуры и др.

Как осуществляется генетический контроль над составом и концентрацией липидов, известно еще очень мало. Липиды — еще «белое пятно» в отношении биохимии генетических контрольных механизмов. Поскольку все реакции синтеза и распада фосфолипидов управляются специфическими ферментами, то, по-видимому, непосредственным объектом генетического контроля являются ферменты. Есть уже указания из лаборатории Чаргаффа (5), что прямым воздействием на ДНК бактерий (заменой тимина в молекуле ДНК на 5-бромурацил у *B. coli*, лишенных тимина) можно повлиять на липидную характеристику этих бактерий и специально на их жирнокислотный состав.

Второй вопрос касается того, в чем состоит биологическая выгода этой специальной комбинации фосфолипидов. В этом вопросе у нас тоже нет ясности. Для объяснения привлекалось много соображений: о значении несомых фосфолипидами зарядов, о способности их образовывать мицеллы, о роли азотсодержащих, холинсодержащих и других групп в молекуле фосфолипидов и т. д., но пока это лишь соображения.

До сих пор речь шла о чертах сходства в фосфолипидной характеристике разных субклеточных частиц и фракций. Еще больший интерес представляют отличия между разными частицами.

**Микросомы** отличаются от других фракций богатством фосфолипидов. Они богаче митохондрий, ядер, нервных окончаний и уступают лишь миелину. Микросомы мозга куры, например, содержат, по нашим данным, 24,2% фосфолипидов на сухой вес фракции, тогда как митохондрии — 21,6%. В мозгу морской свинки, по данным Эйхберг и др. (3), отличие еще резче — в микросомах в 1,4 раза больше липидного фосфора, чем в митохондриях.

За счет каких фосфолипидов обогащена микросомная фракция? Она, прежде всего, содержит много лецитина. У всех изученных животных процент лецитина выше всего в микросомах.



В микросомах много и сфингомиелина, особенно у высших представителей — теплокровных, где процент сфингомиелина в сумме фосфолипидов в микросомах может сравниться даже с миелином (морская свинка), хотя у большинства животных процент сфингомиелина все-таки выше всего в миелине. В микросомах много и монофосфоинозотида, иногда больше, чем во всех других фракциях.

Этаноламинфосфатид в микросомах уступает по количественному содержанию другим клеточным фракциям и почти поровну распределен между диацильной и плазмалогенной формами.

Самое характерное для микросом — это отсутствие кардиолипина. Если он где и обнаруживался, то всегда это было результатом загрязнения фракции митохондриями, о чем можно судить по положительной реакции на сукцинатдегидрогеназу. Надо сделать вывод, что кардиолипин не требуется для осуществления тех функций, которые выполняются цитоплазматическим ретикулумом.

**Митохондрии** характеризуются следующими особенностями фосфолипидного состава. Они не богаты фосфолипидами, уступают в этом отношении микросомам и миелину. Фосфатидилэтаноламин в них представлен преимущественно диацильной формой. Характерно для митохондрий высокое содержание кардиолипина, самое высокое среди клеточных частиц, и высокое содержание монофосфоинозотида. Богатство этими двумя фосфолипидами типично для митохондрий.

Полиглицерофосфатид (кардиолипин) — неперенный компонент многих ферментов цепи переноса электронов; им особенно богата цитохром-С-оксидаза. Монофосфоинозитид играет важную роль в осуществлении мембранной функции; его много и в митохондриях, и в микросомах, и в нервных окончаниях.

**Ядра**, по нашим данным, значительно беднее фосфолипидами, чем другие клеточные фракции при оценке на единицу сухого веса или на единицу белка. В ядрах много нелипидных компонентов, много белка, нуклеиновых кислот. Фосфолипидный состав ядер обладает немногими характерными чертами, он похож на состав гомогената. Но можно отметить значительное содержание в ядрах кардиолипина, что отмечает и Эйхберг и др. (3). Можно думать, что и тут кардиолипин связан с ферментами окислительного обмена, так как вся система энергетического обеспечения имеется, по-видимому, и в ядрах.

**Миелиновая фракция** обладает, конечно, рядом особенностей. В ней много «миелиновых липидов» — цереброзидов, холестерина, сфингомиелина, фосфатидилсерина. В миелине очень много плазмалогенной формы фосфатидилэтаноламина. Эйхберг, Уигтейкер и Даусон (3) нашли в миелине мозга морской свинки много фосфатидной кислоты, больше чем в любой другой фракции. Мы можем подтвердить наличие фосфатидной кислоты в

миелиновой фракции мозга разных животных. Это интересная находка, т. к. в самой метаболически инертной фракции — миелине содержится довольно значительное количество метаболически весьма активного фосфолипида. Возможно, это объясняется отсутствием или низкой активностью в миелине фосфатазы фосфатидной кислоты. В микросомах, где активность фосфатазы фосфатидной кислоты самая высокая (6, 7), саму фосфатидную кислоту мы не могли обнаружить, возможно, вследствие перевеса ее гидролиза над ресинтезом.

«Синапсосомы» по своей фосфолипидной характеристике ничем существенным от гомогенатов не отличаются. Электронно-микроскопическая картина фракции «синапсосом» показывает, что это оторванные нервные окончания, которые состоят из мембран (в том числе пресинаптических), образующих полость, внутри которой заключено большое количество синаптических пузырьков, одна или несколько митохондрий и клеточный сок. Часто к ним присоединены и постсинаптические мембраны. Содержащийся в «синапсосомах» кардиолипин, вероятно, принадлежит митохондриям. «Синапсосомы» содержат и значительные количества монофосфоинозотида.

Д-р Уиттейкер на Симпозиуме по биохимии и функции нервной системы в Ленинграде, в сентябре 1965 года (8), сообщил, что в наружных мембранах «синапсосом» нет цереброзидов, много ганглиозидов и нет плазмалогена, а фосфолипиды оболочек синаптических пузырьков почти не отличаются от среднего состава мембран гомогената мозга.

Все сказанное об особенностях фосфолипидного состава отдельных субклеточных фракций хорошо видно в таблицах «обогащения» их отдельными фосфолипидами (табл. 6 и 7).

Таблица 6

«Обогащение» субклеточных фракций фосфолипидами.  
Мозг куры

Субклеточная фракция	Общий Р липидов	Лецитин	Серинфос-фатид	Этаноламин-фосфатид	Сфинго-миелин	Монофос-фоинозитид	Кардио-липин
Гомогенат	1	1	1	1	1	1	1
Митохондрии	0,94	0,9	1,0	0,97	0,78	1,1	2,2
Микросомы	1,2	1,4	1,3	1,0	1,2	1,3	0
Ядра	0,16	0,9	1,0	1,0	0,7	1,1	1,7
Миелин	—	0,56	1,8	1,2	1,5	0,7	0

Таблица 7

**«Обогащение» субклеточных фракций фосфолипидами.  
Мозг морской свинки**

Субклеточная фракция	Общий Р липидов	Лецитин	Серинфосфатид	Этаноламинфосфатид (днацил)	Этаноламинфосфатид (плазмалоген)	Сфингомиелин	Фосфоинозитид	Кардиолипин	Фосфатидная кислота
Гомогенат	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Митохондрии	0,82	0,88	0,34	1,23	0,38	0,31	1,22	5,8	0,7
Микросомы	1,27	1,53	1,16	1,19	1,02	1,27	1,92	0,6	0
Ядра	0,95	0,96	0,89	1,0	0,94	0,74	0,81	1,61	0,96
Миелин	1,27	1,25	1,43	1,33	2,56	1,23	1,13	0	2,6
Синапсомы	1,15	1,29	1,33	1,40	0,97	0,64	1,32	1,23	1,27

«Обогащение» рассчитывается по отношению  $\frac{\text{мг Р/сух. вес гомогената}}{\text{мг Р/сух. вес фракции}}$  и говорит о том, насколько богаче или беднее данная фракция отдельным фосфатидом по сравнению с целым гомогенатом. Данные по «обогащению» для мозга куры приведены в табл. 6 и для мозга морской свинки по работе (3) — в табл. 7.

Из таблиц 6 и 7 видно, что монофосфоинозитидом обогащены митохондрии, микросомы и «синапсомы» — все частицы с активным транспортом через мембраны, ведающие энергетикой клетки, разными синтезами, в частности белковым, и синаптической передачей импульсов, выработкой и освобождением медиаторов, ацетилхолина, катехоламинов и др. Таблицы «обогащения» суммируют все сказанное выше об особенностях фосфолипидного состава субклеточных фракций.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Биохимия, **28**, 978, 1963.
2. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Ж. эволюц. биохимии и физиологии, **1**, 16, 1965.
3. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C., Biochem. J., **92**, 91, 1964.
4. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Биохимия, **29**, 1111, 1964.
5. Karkas J. D., Turler H., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **111**, 96, 1965.
6. Hokin M. R., Hokin L. E., J. Biol. Chem., **234**, 1387, 1959.
7. Помазанская Л. Ф., Ж. эволюц. биохимии и физиологии, **1**, 320, 1965.
8. Уиттейкер В. П., Сб.: Биохимия и функция мозга. Изд. «Наука» (в печати).



## ГАНГЛИОЗИДЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Я. А. Эпштейн, А. М. Максимова, М. Қ. Аюбов

Кафедра биохимии Таджикского госмединститута им. Авиценны, Душанбе

Интерес к изучению ганглиозидов головного мозга возник у нас при попытке объяснить причины накопления значительного количества неорганических оснований в мозговой ткани при возбуждении ЦНС. В дальнейшем, познакомившись с работами других и в особенности с работами Мак Ильвейна и его сотрудников (1), мы убедились в том, что поиски наши в сторону возможного участия ганглиозидов в связывании неорганических катионов вполне обоснованы. Если в покоящейся ткани ганглиозиды и имеющиеся в их составе сиаловые кислоты через карбоксильные группы связаны с какими-то катионами органической природы, по всей вероятности, со щелочными белками, то при возбуждении эта связь теряется и на место щелочных белков становятся неорганические катионы.

Увеличение содержания неорганических катионов при возбуждении на 10—15% происходит и в других тканях (2, 3). В продуцирующей соляную кислоту слизистой желудка накопление неорганических оснований сопровождается увеличенным содержанием сильнокислотных групп (1). Возможно таковыми являются кислотные группы первой ступени диссоциации РНК в слизистой желудка, чье участие в секреции HCl несомненно (4). В возбужденной мозговой ткани увеличенное содержание неорганических оснований связано с увеличенным содержанием или обнажением более слабых кислот, чем пикриновая кислота, с помощью которой определяют так называемые «буферные» кислоты (5). В табл. 1 показано различие в содержании «буферных» кислот и всех оснований в мозговой ткани и в слизистой желудка в покое и после возбуждения. Все основания мы определяли по несколько видоизмененному нами (2) электролитическому методу Киса (6).

Пользуясь тем же электролитическим методом определения всех неорганических оснований в ткани (2), мы (7) действитель-

Таблица 1

Содержание неорганических оснований и «буферных» кислот в слизистой желудка при секреции ею HCl и в мозговой ткани после возбуждения ЦНС (2, 3) в мкг·экв в 1 г свежей ткани

Состояние ткани	Неорганические основания	«Буферные» кислоты
Слизистая желудка в покое	$171,7 \pm 6,9$	$84,8 \pm 1,9$
При секреции HCl	$205,6 \pm 5,0$	$83,4 \pm 2,7$
Мозг крысы в покое	$205,4 \pm 3,1$	$135,3 \pm 2,7$
После возбуждения камфорой	$226,6 \pm 4,9$	$173,1 \pm 7,8$
„ „ электрическим током		$176,0 \pm 8,0$
„ „ условнорефлекторно		$162,6 \pm 5,2$
В уретановом наркозе	$193,0 \pm 5,7$	$143,0 \pm 4,9$
„ и возбуждении камфорой	$189,8 \pm 3,0$	$133,5 \pm 3,4$

но в страндиновой фракции мозговой ткани, полученной по Фольчу (8) и после возбуждения ЦНС камфорой, обнаружили удвоенное количество оснований (табл. 2).

Таблица 2

Количество неорганических оснований в страндиновой фракции мозговой ткани крысы в мкг·экв/г свеж. ткани в покое и после возбуждения камфорой

В покое	После возбуждения	P
$16,90 \pm 1,99$	$34,20 \pm 0,96$	$< 0,001$

Для покоящейся мозговой ткани в ее страндиновой фракции при кондуктометрическом титровании (рис. 1) действительно оказалось совпадающее с количеством неорганических оснований количество сиаловой кислоты (7), а именно,  $15,8 \pm 1,2$  мкг·экв/г свежей ткани. При возбуждении ЦНС камфорой, однако, количество сиаловой кислоты вполне явно уменьшилось и ее стало  $10,7 \pm 1,1$  мкг·экв/г свеж. ткани. Причина такого несоответствия в количестве сиаловой кислоты и неорганических оснований следует, пожалуй, искать в структурных изменениях ганглиозидов и возможно в деацетилировании аминокислот, входящих в их состав.

Если определять содержание сиаловой кислоты в ганглиозидной фракции мозговой ткани по орциоловой пробе, уменьшения ее количества не обнаруживается. При окраске с орцином, с максимумом поглощения при 550 мкм, оказывается, что в покое на 1 г свежей ткани интенсивность поглощения соответственно равна  $1,39 \pm 0,11$ , а после возбуждения —  $1,24 \pm 0,10$ . Разности в определяемом количестве сиаловой кислоты нет ( $P > 0,1$ ).

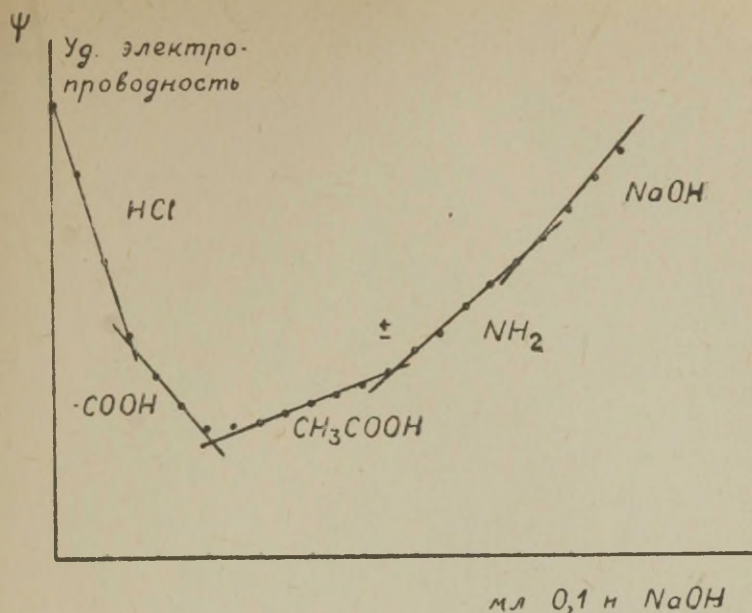


Рис. 1. Кондуктометрическое титрование ганглиозидов головного мозга крысы в водной фракции, полученной по Фольчу после её элюции из фенолсульфонового катионита в водородной форме. По оси ординат — изменение удельной электропроводности раствора по мере нейтрализации избытка  $\text{HCl}$ ,  $\text{COOH}$ -групп сиаловой кислоты свободной уксусной кислоты и аминогрупп аминсахаров в ганглиозидах. Через  $\pm$  обозначено изменение окраски фенолфталеина, добавленного к титруемому раствору.

Если, однако, сравнить определяемое таким образом количество сиаловой кислоты с титруемым по  $\text{COOH}$ -группам кондуктометрическим титрованием, то мы должны прийти к выводу, что, по-видимому, интенсивность окраски явно изменена в зависимости от того, имеется ли сиаловая кислота в составе ганглиозидов или она свободна. В покоящейся ткани, при расчете на один грамм-эквивалент сиаловой кислоты, коэффициент поглощения равен  $88 \cdot 10^4$ , а после возбуждения он стал  $116 \cdot 10^4$  (7).

О том, что при возбуждении ЦНС камфорой происходят какие-то изменения с ганглиозидами, можно судить по тому, что после возбуждения иногда частично, а иногда полностью типичные для страндина нитевидные кристаллы исчезают. На их месте при этом появляются игольчатые кристаллы, типичные для свободной сиаловой кислоты (рис. 2). Изменения в кристаллической структуре ганглиозидов наблюдал Фольч (9), а их исчезновение при полном кислотном гидролизе у нас Маркаев (10).



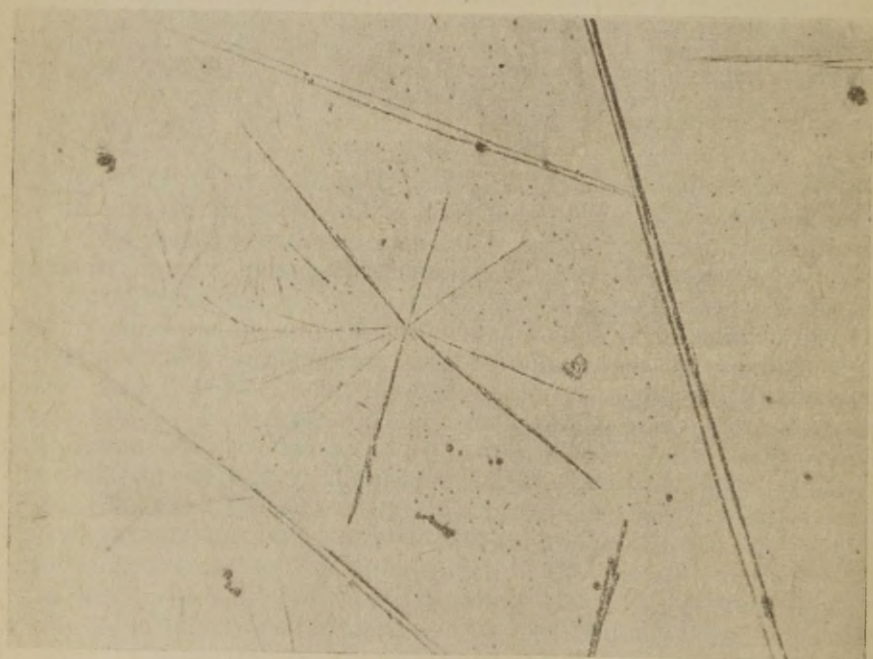




Рис. 2. Нитевидные кристаллы ганглиозидов головного мозга крысы (а), после частичного (б) и полного (в) распада с освобождением свободной сиаловой кислоты (звездчатые кристаллы).

Действительные изменения в содержании сиаловой кислоты удается обнаружить, пользуясь хроматографическим методом анализа. М. К. Аюбову удалось наладить тонкослойную хроматографию на силикагеле ганглиозидов серого вещества коры головного мозга по методике, разработанной М. И. Прохоровой с сотр. (11), и выявить явные изменения в относительных количествах семи отдельных фракций при закрытой и дозированной травме черепа, не приводящей к разрушению мозговой ткани или кровоизлиянию в ней (12). Данные его работы приводим в табл. 3. В ней даны значения содержания сиаловой кислоты, определяемой по методу Уоррена (13) в мкг на 1 г свежей ткани мозга. По этим данным видно, что уже через три часа после сотрясения мозга количество трисиалоганглиозидов уменьшается, а дисиалоганглиозидов увеличивается. Несколько нарастает количество моносиалоганглиозидов. Постепенное, начинающееся уже через сутки исправление нарушенных соотношений возвращается постепенно к норме, если почему-либо животное не погибает. Количество сиаловой кислоты в соответствующих гомогенатах представлено в табл. 4.

Таблица 3

Количество сиаловой кислоты мкг/г свежей ткани серого вещества коры головного мозга в различных фракциях в разные сроки после закрытой травмы черепа. В скобках число случаев

Сроки после травмы		I	II	III	IV	V	VI	VII
Контроль (7)	$\pm$	39 3,3	26 1,8	33 2,3	13 0,5	7,9 0,2	7,3 0,4	5,1 0,2
Через 3 часа (6)	$\pm$	7,4 0,2	14 1,7	30 2,4	50 2,6	63 0,9	25 0,9	7 1,7
Через 140 час. (6)	$\pm$	12,4 1,4	23 1,5	24 1,3	54 5	32 4,7	12,5 2,7	9,5 1,4
Через 80 час. (7)	$\pm$	6,3 0,2	6,5 1,6	24 3,2	34 3	63 2,7	15,6 0,9	7 9,2
Через 140 час. (6)	$\pm$	11,6 1,5	32,6 3,4	21,5 1,8	15 1,2	34,3 1,2	9,6 0,2	5,3 0,2
Через 12 суток (4)	$\pm$	18 0,6	38,3 0,5	31 0,6	17,2 0,9	17,8 0,8	11,8 0,7	6,6 0,8

Таблица 4

Содержание сиаловой кислоты, определяемой по Уоррену (13), содержащей ганглиозиды фракции мозговой ткани, полученной по Фольчу (9), из гомогенатов серого вещества коры мозга в мкг на 1 г свежей ткани у контрольных кроликов и в разные сроки после дозированной закрытой травмы черепа. В скобках число случаев

Контроль	Сроки после травмы черепа				
	3 часа	24 часа	80 часов	140 часов	12 суток
377 $\pm 8,4$ (10) $P < 0,01$	569 $\pm 9,0$ (7)	574 $\pm 10,5$ (6)	594 $\pm 8,0$ (7)	558 $\pm 4,7$ (5)	443 $\pm 3,3$ (5)

Как при возбуждении ЦНС камфорой, сопровождающемся всегда судорогами, так и после травмы черепа без явного поражения самой мозговой ткани нормальное кровообращение и кровоснабжение мозга нарушено. Вследствие этого в крови имеется явная гиперкапния, а в ткани — гипоксия. Косвенные указания на изменения в обмене веществ в мозговой ткани явля-



ются изменения в содержании молочной кислоты и бикарбоната в мозговой ткани, крови или СМЖ представлены в табл. 5. Изменения с явным увеличением содержания бикарбонатов и более значительным — молочной кислоты в последующем весьма длительно сохраняются, в отличие от того, что наблюдал Аюбов в СМЖ у людей после закрытой травмы черепа. У людей не-

Таблица 5

Содержание бикарбонатов, определяемых кондуктометрическим титрованием по Я. А. Эпштейну, и молочной кислоты, определяемой по методу Баркер и Саммерсону, в СМЖ у контрольных кроликов и в разные сроки после закрытой травмы черепа

	Контроль	Сроки после травмы черепа				
		3 часа	24 часа	80 часов	140 часов	12 суток
Молочная кислота мг %	17,8 ±0,8	29,8 ±0,3	31,5 ±0,3	31,6 ±1,7	23,5 ±1,2	20,0 ±0,5
НСО <sub>3</sub> <sup>-</sup> мкг · экв/г ткани	19,0 ±0,2	23,0 ±1,3	19,8 ±1,4	24,8 ±1,3	24,7 ±0,7	23,5 ±1,2

сколько быстрее выравниваются респираторные нарушения и содержание бикарбонатов быстрее снижается до нормы, а высокое содержание молочной кислоты, характеризующее обменные процессы в мозговой ткани, также длительно сохраняются и в СМЖ пострадавших людей.

По всей вероятности, Ульф с сотр. (15) прав, считая, что основной причиной уменьшенного содержания сиаловой кислоты в мозговых ганглиозидах в исследованных им условиях является гиперкапния. В конечном итоге увеличенное содержание угольной кислоты в крови и ткани приводит к подкислению в ткани и специфичность действия связана со способностью угольной кислоты проникнуть к месту ее действия. Такое явление, по-видимому, имеет место при нарушении окисления и фосфорилирования в митохондриях цветной капусты (16). Другие метаболитические кислоты такого действия на митохондрии в цветной капусте не оказывали, так как они, в отличие от угольной кислоты, туда не проникали.

Сила связи отдельных звеньев тетрасахарида в ганглиозиде несомненно различная, в чем следует искать причину различий в составе ганглиозидов.

В зависимости от крепости глюкозидной связи с галактозой или глюкозой тетрасахарида, из состава ганглиозида могут по-

степенно гидролитически отщепляться одна или две, а возможно, и все три сиаловых кислоты (17). Таким образом трисиалоганглиозид превращается в ди- или моносиалоганглиозид. При полном отщеплении всей сиаловой кислоты ганглиозид превращается в цереброзид.

Следует обратить внимание на имеющиеся в ганглиозиде четыре N-ацильных связи: одна в галактозамине тетрасахаридной цепочки, три в сиаловой кислоте и одна по аминогруппе в сфингозине. В этом случае с аминогруппой связан остаток высокомолекулярной жирной кислоты (чаще всего стеариновой). Все остальные аминогруппы связаны с остатком уксусной кислоты.

При кондуктометрическом титровании растворов ганглиозидов, пропущенных через фенолсульфоновый катионит в водородной форме (7), по-видимому, происходит деацетилирование аминосахаров в их составе. Об этом мы судили по тому, что второй отрезок кривой кондуктометрического титрования (рис. 1) непрерывно увеличивается во время титрования и тем больше, чем дольше титруем. Деацетилирование завершается, если в присутствии избытка HCl прокипятить достаточно долго раствор ганглиозидов (10).

В дальнейшем нам удалось показать, что N-ацетильная связь в аминосахарах весьма рыхлая (18). В этом мы убедились, следя за ослаблением окраски ацетилированных ганглиозидов и аминосахаров с п-диметиламинобензальдегидом, как это предлагали Морган и Эльсон (19). Определив константы скорости кислотного гидролиза N-ацетильных связей при двух различных температурах, можно по формуле Аррениуса выявить значение энергии активации процесса деацетилирования. Поскольку всякий кислотный гидролиз протекает как псевдомономолекулярная реакция, то для того, чтобы пользоваться формулой для определения константы реакции первого порядка, следует знать начальную концентрацию ацетилированного соединения. Так как интенсивность окраски по реакции Моргана и Эльсона (19) определяли в каретке с двойной стенкой, через которую из ультратермостата пропускали нагретую до желаемой температуры воду, то, экстраполируя до нулевого времени, мы узнавали первоначальную концентрацию, выраженную в значениях оптической плотности. Изменение концентрации ацетильного соединения тоже определяли в тех же единицах оптической плотности. По формуле для реакций первого порядка

$$K = \frac{2,3}{t} \lg \frac{a}{a-x},$$

где  $a$  — исходная концентрация ацетилированного аминосахара,

$x$  — количество деацетилированного аминсахара,

$t$  — время в минутах,

$K$  — константа скорости реакции,

узнавали значение константы скорости реакции деацетилирования. Пользуясь формулой Аррениуса и зная значения констант скоростей деацетилирования при двух различных температурах, узнавали значение энергий активации деацетилирования

$$E = \frac{2,3 \cdot R \cdot T_1 T_2}{T_2 - T_1} \lg \frac{K_2}{K_1}.$$

Особенно низкой она оказалась для деацетилирования ганглиозидов серого вещества коры головного мозга, полученных по Фольчу (8), и равной около 5 ккал/моль. Деацетилирование аминсахаров печеночной ткани, определяемое по Моргану и Эльсону, оказалось почти в два раза менее легким. Энергия активации деацетилирования имеющихся ацетилованных аминсахаров оказалась равной примерно 9 ккал/моль (18).

Энергия активации порядка 5 ккал/моль очень невелика, что заставляет предполагать, что ацетилированные аминсахара, возможно, являются макроэргическими соединениями подобно ацетилованному по иминогруппе в имидазольном кольце гистидина (20).

По-видимому, облегченный гидролиз при подкислении имеет место при любых нарушениях кровоснабжения и кровообращения в мозговой ткани. При возбуждении камфорой Максимова (21) обнаруживала и уменьшенную способность ткани к ацетилованию, если судить по пониженному в этом случае содержанию в ней КоА. Этим, как оказалось, А. М. Максимова подтвердила не известную ей до этого работу К. Г. Громовой (22).

В более легком деацетиловании аминсахаров мозговой ткани может быть следует искать более легкий процесс дезаминирования глюкозамина по сравнению с печеночной тканью, о котором на этой конференции говорила З. Г. Броницкая. Ведь дезаминирование аминсахара, по всей вероятности, возможно только после того, как по аминогруппе аминсахара произошло деацетилование. В мозговой ткани, как мы видели, оно происходит почти в два раза легче, чем в печеночной ткани: энергия активации в первом случае порядка 5 ккал/моль, во втором случае — порядка 9 ккал/моль.

### Выводы

Ганглиозиды коры головного мозга весьма нестойкие соединения. Они встречаются как в виде три-, так и ди- и моносиалоганглиозидов. Особенно резкие изменения в соотношениях этих трех видов ганглиозидов наступают при закрытой травме



черепа. Как при возбуждении ЦНС камфорой, так и при закрытой травме черепа, основную причину деградации ганглиозидов следует усматривать в появляющейся при этом гиперкапнии в согласии с мнением Ульфа (15). При возможном доступе к ганглиозидам других кислот (например, молочной), и они способны вызывать кислотный гидролиз связи сиаловой кислоты с депочкой тетрасахарида в ганглиозиде, а также деацетилирование по аминосвязям. Возможно, что эти явления прижизненно связаны не в малой мере с имеющим при этом место усилением активности соответствующих ферментов — нейрамидазы и деацетилазы.

Энергия активации деацетилирования N-ацетильной связи в мозговой ткани порядка 5 ккал/моль и она является макроэргической. В печеночной ткани энергия активации деацетилирования N-ацетильной связи порядка 9 ккал/моль.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Мак Ильвейн Г., В сб.: Биохимия и ЦНС, 19, 1962.
2. Эпштейн Я. А., Гордон Б. Г., Биохимия, 15, 216, 1950.
3. Гордон Б. Г., Бюлл. эксп. биол. мед., 10, 262, 1950; 1951.
4. Эпштейн Я. А., Тр. совещ. физиол. и патол. пищевар., Тарту, 312, 1959. Тарт. унив., 312, 1959.
5. Эпштейн Я. А., Биохимия, 11, 69, 1946.
6. Keys A., J. Biol. Chem., 114, 449, 1936.
7. Эпштейн Я. А., Максимова А. М., Ж. эволюц. физиол. биох. (в печати).
8. Folch J., Arsove S., Meath J. A., J. biol. chem., 191, 819, 1951.
9. Folch J., Fed. Proc., 15, 254, 1960; Physiol. Revs., 37, 539, 1957.
10. Маркаев Т., Дипл. работа химфака Тадж. госунив., 1965.
11. Прохорова М. И., Пенева Т. И., Романова М. С., Туманова С. Ю., Укр. биох. ж., 37, 778, 1965.
12. Аюбов М. К., ДАН Тадж. ССР (в печати).
13. Warren L. J., Biol. Chem., 234, 197, 1959.
14. Аюбов М. К., Здравоохр. Тадж. (в печати).
15. Lowden J. A., Wolfe L. S., Canad. J. Biochem., 42, 1703, 1964.
16. Miller G. M., Hsu Wan-Jean, Biochem. J., 97, 615, 1965.
17. Polonovsky J., Soc. Chim. Biol., 46, 833, 1964.
18. Эпштейн Я. А., Маркаев Т., ДАН Тадж. ССР (в печати).
19. Morgan W. T., Elson L. A., Bioch. J., 28, 988, 1934.
20. Пюльман Б., Пюльман А., Квантовая биохимия, изд. «Мир», 1965.
21. Максимова А. М., ДАН Тадж. ССР (в печати).
22. Громова К. Г., Фосфорилирование. Сб. тр. ИЭМ, 1965.

## ФОСФАТИДНАЯ КИСЛОТА В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗГУ

А. А. Смирнов, Е. В. Чирковская

Лаборатория биохимии нервной системы Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград

Повышенный интерес к фосфатидной кислоте за последние годы вызван тем, что это соединение является очень важным промежуточным звеном в биосинтезе глицерофосфатидов и триглицеридов (1). Высказывались предположения об участии ее в активном транспорте ионов через клеточные мембраны (2—5).

Фосфатидная кислота — один из наиболее кислых и полярных липидов. В состав этого сложного эфира входит глицерин, молекула фосфорной кислоты и две молекулы жирных кислот. Жирные кислоты, входящие в ее состав, могут иметь разную длину углеродной цепи, различную степень насыщенности и поэтому фосфатидных кислот в природе может быть очень много.

В животных тканях фосфатидной кислоты содержится мало. По нашим предварительным данным в мозгу лягушки она составляет 0,6% от всех фосфатидов, в мозгу черепахи — 1,2%, голубя — 0,7%, крысы — 1,4%. Но при очень небольшом содержании в нервной ткани, он обладает высокой скоростью обмена.

Для определения фосфолипидов, в том числе и фосфатидной кислоты, применяется ряд методов. В последние годы широко распространенным является метод хроматографического разделения на бумаге водорастворимых продуктов гидролиза фосфатидов, предложенный Даусоном (6). Метод позволяет раздельно определять не только эфирные, но и энольные (плазмалогенные) формы фосфолипидов, и в этом его большое достоинство. Однако этот надежный способ определения фосфатидов очень трудоемок.

Из других методов следует упомянуть о способе разделения фосфолипидов с помощью тонкослойной хроматографии (7). Однако этот метод, по-видимому, не дает возможности выделять фосфатидную кислоту без примеси других фосфолипидов.

Многими исследователями для определения фосфолипидов применяется методика восходящей хроматографии на бумаге,

пропитанной кремневой кислотой (8, 9). Этот простой и удобный метод, позволяющий выделять большинство фосфолипидов, оказался при несколько измененных условиях разделения очень удобным и для выделения фосфатидной кислоты.

Задачей настоящей работы было подобрать условия для быстрого и надежного выделения фосфатидной кислоты из липидных экстрактов нервной ткани и исследовать ее содержание и скорость обмена в развивающемся мозгу крысы.

### Методика

Поставленная в работе задача требовала прежде всего подобрать условия для простого и надежного способа выделения фосфатидной кислоты из липидных экстрактов мозга. С этой целью проведено несколько серий опытов с выделением ее на разных образцах хроматографической бумаги с разной толщиной слоя кремневой кислоты, наносимого на эту бумагу. Изменялось также относительное содержание компонентов растворителей, рекомендованных Маринетти (9), температурные условия и длительность разделения. В качестве свидетеля использовался препарат фосфатидной кислоты, полученный из лецитина яичного желтка (10).

В силу большой подвижности (высокого значения  $R_f$ ) фосфатидной кислоты для ее выделения оказалось необходимым брать гораздо более короткие сроки разделения, чем для выделения других фосфолипидов. Наилучшие результаты были получены при 85—90-минутной восходящей хроматографии в растворителе: ледяная уксусная кислота-вода-дибутиловый эфир-хлороформ (70 : 11 : 80 : 12). Другие фосфатиды за такой короткий срок не разделяются; для их выделения требуется не менее 20—24 часов.

При 90-минутном разделении фосфатидная кислота выделяется в виде компактного, хорошо выявляемого роданином 6-Ж лилового пятна. Лучшие результаты получены на бумаге марки FN-11 (ГДР), когда для пропитки использовался силикат, приготовленный по следующей прописи: 300 г водной кремневой кислоты (Ленинградский завод «Красный Химик») +

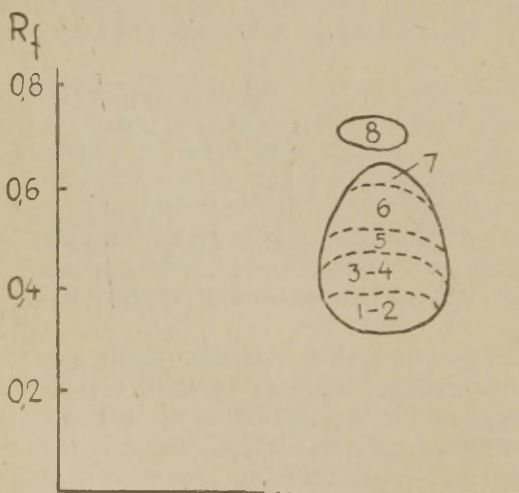


Рис. 1. Хроматограмма фосфолипидного экстракта мозга крысы.

1—2 — инозитолфосфатид + сульфocereброзид; 3—4 — сфингомиелин + лецитин; 5 — серинфосфатид; 6 — этаноламинфосфатид; 7 — полиглицерофосфатиды; 8 — фосфатидная кислота.



250 мл  $H_2O$  + 310 мл 7н NaOH. Смесь нагревалась 4—5 часов на водяной бане сначала при 60—70°С, а затем при 90—100°С до образования гомогенного прозрачного раствора. Объем полученного раствора доводился водой до 890 мл.

Способ пропитки бумаги и подготовка ее для хроматографии описаны нами ранее (11).

На бумажный лист размером 17×22 см, пропитанный кремневой кислотой, наносилось 6 проб липидных экстрактов, содержащих примерно по 10 мкг липидного фосфора. Бумага свертывалась в трубку и ставилась для восходящего хроматографирования в растворителе на 90 минут при 23°С в круглую банку диаметром 10 см и высотой 18 см с пришлифованной крышкой.

Результаты такого выделения фосфатидной кислоты схематически изображены на рис. 1.

Изучение содержания фосфатидной кислоты и скорости включения в нее радиоактивного фосфора в развивающемся мозгу проводилось на 1—2-дневных, 13—14-дневных и взрослых крысах.

Радиоактивный фосфор ( $P^{32}$ ) вводился подкожно в количестве 10 мкюри/1 г веса животного. Через 3 часа животное убивалось отрезанием головы. У крыс в возрасте до 14 дней для анализа брался верхний слой больших полушарий мозга, а у взрослых — кора больших полушарий.

Извлечение и подготовка липидного экстракта для хроматографии, а также элюирование с бумаги пятен фосфатидной кислоты и другие детали определения ее количества и радиоактивности производились так, как было описано для других фосфатидов мозга (11).

## Результаты исследования

В таблице 1 приведено содержание фосфатидной кислоты в коре больших полушарий мозга крысы на разных уровнях онтогенетического развития, выраженное в миллиграммах фосфора на грамм сухого веса ткани. Для сравнения приведены данные и для других фосфатидов, полученные нами в опытах с хроматографическим разделением в течение 20—24 часов.

Таблица 1

Изменения содержания фосфолипидов (в мг Р/г сухой ткани) в коре больших полушарий мозга крысы в онтогенезе

№ пят- на	Название фосфолипида	Возраст в сутках		Взрослые
		1—2	13—14	
1.	х-липид *	следы	следы	следы
2.	Монофосфоинозитид	0,20	0,31	0,26
3.	Сфингомиелин	0,12	0,26	0,46
4.	Лецитин	2,62	3,49	3,00
5.	Серинфосфатид	0,54	0,82	0,98
6.	Этаноламинфосфатид	0,94	1,75	2,10
7.	Полиглицерофосфатиды	0,10	0,14	0,19
8.	Фосфатидная кислота	0,02	0,07	0,10

\* Как недавно обнаружено, х-липид является сульфocereброзидом.

Из приведенных цифр видно, что содержание фосфатидной кислоты в мозговой ткани с возрастом отчетливо нарастает с 0,02 мг у 1—2-дневных до 0,1 мг у взрослых крыс. Сходная картина, только выраженная в несколько меньшей степени, наблюдалась в развивающемся мозгу крысы и в отношении некоторых других фосфолипидов — сфингомиелина, серинфосфатида, этаноламинфосфатида. Все эти фосфатиды входят в состав миелина и нарастание их количества особенно выражено в период миелинизации (13).

В миелиновой фракции фосфатидной кислоты больше, чем в других субклеточных фракциях мозга (14). Поэтому возможно, что увеличение содержания этого фосфатида в ходе развития в какой-то степени связано с миелинизацией, с быстро идущим процессом образования миелиновых фосфолипидов.

Таблица 2

Относительная удельная активность (О.У.А.) фосфора фосфолипидов коры больших полушарий мозга крысы в онтогенезе

$$\text{О.У.А.} = \frac{\text{У.А. фосфолипида}}{\text{У.А. суммарных фосфолипидов}}$$

№ пята	Название фосфолипида	Возраст в сутках		Взрослые
		1—2	13—14	
1.	х-липид	+	+	+
2.	Монофосфоинозитид	7,4	7,5	10,4
3.	Сфингомиелин	1,0	0,6	0,5
4.	Лецитин	0,5	0,8	0,7
5.	Серинфосфатид	0,5	0,3	0,4
6.	Этаноламинфосфатид	0,6	0,4	0,5
7.	Полиглицерофосфатиды	6,1	1,1	1,6
8.	Фосфатидная кислота	59,0	5,5	6,9

Из табл. 2 видно, что скорость включения  $P^{32}$  в фосфатидную кислоту мозга 1—2-дневных крыс значительно выше, чем у двухнедельных и взрослых животных. Это дает основание предполагать, что наиболее высокая скорость синтеза ее происходит в мозгу крысы в первые дни после рождения. К двухнедельному возрасту синтез ее снижается и при дальнейшем развитии мозга, по-видимому, меняется мало.

Меченый фосфор включается и в некоторые другие фосфолипиды мозга 1—2-дневных крыс быстрее, чем взрослых животных (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что в первые дни постнатальной жизни синтез фосфолипидов в мозгу крысы идет быстро и в образовании их участвует фосфатидная кислота с повышенной радиоактивностью. Снижение синтеза фосфолипи-

дов и уменьшение скорости включения  $P^{32}$  в фосфатидную кислоту с возрастом животного приводят к снижению радиоактивности всех этих соединений.

Результаты проведенного исследования количественного содержания фосфатидной кислоты и скорости включения в нее меченого фосфора на разных уровнях онтогенетического развития хорошо согласуются с предварительными данными, полученными нами ранее (13, 15).

## Выводы

В работе описана модификация метода выделения фосфатидной кислоты с помощью восходящей хроматографии на бумаге, пропитанной кремневой кислотой. Метод позволяет надежно и быстро определять малые количества этого фосфатида в мозговой ткани.

Исследованы изменения в содержании фосфатидной кислоты и скорости включения в нее радиоактивного фосфора в развивающемся мозгу крысы. Установлено, что в первые дни постнатальной жизни крысы фосфатидной кислоты содержится в мозгу (при расчете на сухой вес ткани) меньше, а скорость включения в нее радиоактивного фосфора ( $P^{32}$ ) значительно выше, чем у взрослого животного.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кеннеди Е. П., Биосинтез липидов. Тр. Пятого международн. биохим. конгресса. Симпозиум VII, 105, 1962.
2. Hokin L. E., Hokin M. R., J. Biol. Chem., **233**, 822, 1958.
3. Hokin L. E., Hokin M. R., J. Biol. Chem., **234**, 1381, 1959.
4. Galliard T., Hawthorne J. N., Biochim. Biophys. Acta, **70**, 479, 1963.
5. Vignais P. M., Vignais P. V., Lehninger A. L., J. Biol. Chem., **239**, 2010, 1964.
6. Dawson R. M. C., Hemington N., Davenport J. B., Biochem. J., **84**, 497, 1962.
7. Abdel-Latif A. A., Abood L. G., J. Neurochem., **12**, 157, 1965.
8. Marinetti G. V., Stotz E., Biochim. Biophys. Acta, **21**, 168, 1956.
9. Marinetti G. V., J. Lipid Res., **3**, 1, 1962.
10. Kates M., Canad. J. Biochem. Physiol., **33**, 575, 1955.
11. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., Биохимия, **26**, 1027, 1961.
12. Dawson R. M. C., Eichberg J., Biochem. J., **96**, 634, 1965.
13. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Биохимия, **27**, 859, 1962.
14. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C., Biochem. J., **92**, 91, 1964.
15. Манукян К. Г., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Биохимия, **28**, 246, 1963.



## ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ ФОСФОЛИПИДОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ МОЗГА КРОЛИКОВ

Н. И. Правдина, Л. Ф. Помазанская, С. А. Забелинский

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

Работами последних лет установлено, что субклеточные фракции нервной ткани (ядра, митохондрии, микросомы, мислин) с заведомо разной функцией имеют очень близкий набор фосфолипидов (1). Вместе с тем хорошо известно, что в состав индивидуальных фосфолипидов входят не две жирных кислоты, как это можно было предполагать, исходя из химического строения фосфолипидов, а значительно больше. Некоторые фосфолипиды содержат более 20 жирных кислот. Из этого следует, что каждый «индивидуальный» фосфолипид объединяет целую группу близких веществ, различающихся между собой жирнокислотным составом, а вероятно, и функцией. Данных о жирнокислотном составе «индивидуальных» фосфолипидов различных субклеточных структур мозга в литературе почти нет. Между тем выяснение этого вопроса представляет интерес для понимания роли фосфолипидов в метаболизме нервной клетки.

Задача настоящей работы заключалась в сравнительном изучении жирнокислотного состава лецитина, этаноламинфосфатида, серинфосфатида и сфингомиелина митохондрий и микросом серого вещества больших полушарий мозга взрослых кроликов.

### Материал и методика

Опыты ставили на взрослых кроликах. Животных убивали отсечением головы. Извлечение мозга и дальнейшую его обработку производили в холодной комнате при температуре около 0°С.

Митохондрии и микросомы выделяли из серого вещества больших полушарий мозга при помощи дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности раствора сахарозы.

Фосфолипиды экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1). «Индивидуальные» фосфолипиды из липидного экстракта выделяли последовательной хроматографией вначале на колонках из диэтиламиноэтилцеллюлозы (2).

затем на колонках из силикагеля (КСК, Воскресенский химкомбинат) по несколько измененной схеме, предложенной Ханаханом и сотр. (3).

Чистоту «индивидуальных» фосфолипидов проверяли при помощи хроматографии на бумаге, пропитанной кремневой кислотой (4).

Препараты «индивидуальных» фосфолипидов подвергали метанолизу по Штоффелю и др. (5) абсолютным метанолом с 5% HCl. Метанолиз сфингомиелина проводили абсолютным метанолом с 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение 5 часов при 80° С.

Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газо-жидкостном хроматографе «Хром-2» с пламенно-ионизационным детектором. Разделение смеси метиловых эфиров жирных кислот проводили на полярной фазе (15% диэтиленгликольсукцинат) при температуре 186° и 192° С. Длина колонки 2 м 40 см, внутренний диаметр 6 мм. Наполнитель — Хромосорб W.

Пики идентифицировали несколькими путями: сравнением относительных объемов удерживания анализируемых проб с относительными объемами удерживания чистых стандартов и с относительными объемами удерживания, приводимыми в литературе; определением углеродного числа по Вудфорду и Ван Генгу (6); гидрированием части пробы в присутствии двуокиси платины в качестве катализатора (7) и сравнением жирнокислотного состава пробы до и после гидрирования.

Количественной оценкой для каждой кислоты служила площадь пика, вычисляемая умножением высоты пика на его ширину при полувысоте.

Содержание отдельных кислот выражали в % от суммы всех жирных кислот в пробе.

Для предохранения ненасыщенных жирных кислот от окисления всегда, когда это было возможно, работу вели в атмосфере инертного газа. Препараты метиловых эфиров жирных кислот хранили при -10° С в атмосфере аргона.

## Полученные результаты и их обсуждение

Полученный цифровой материал, характеризующий жирнокислотный состав изученных фосфолипидов, представлен в таблицах 1 и 2.

В лецитине (табл. 1), независимо от того, к какой субклеточной фракции он принадлежит, основными жирными кислотами являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая. Жирнокислотный состав лецитина митохондрий и лецитина микросом чрезвычайно близок. В нем преобладают насыщенные кислоты (60%). Доминирующей насыщенной кислотой является пальмитиновая. На ее долю приходится 50% от суммы всех кислот. Ненасыщенные кислоты представлены, главным образом, моеновой — олеиновой кислотой (26%). Полиненасыщенных кислот очень мало (около 7%).

В этаноламинфосфатиде (табл. 1) набор жирных кислот по существу такой же, как и в лецитине, но количественное содержание их иное.

В настоящей работе не производили отделения диацильной формы этаноламинфосфатида от плазмалогенной формы. Поэтому приводимый жирнокислотный состав этаноламинфосфатидов включает в себя метиловые эфиры жирных кислот и альдегидов (диметилацетали — ДМА).

Основной насыщенной кислотой в этаноламинфосфатиде яв-

Таблица 1

Состав жирных кислот лецитина, этаноламинфосфатида и серинфосфатида митохондрий и микросом серого вещества больших полушарий мозга кроликов (в % от суммы всех жирных кислот)

Кислота *	Средний относительный объем удерживания на диэтиленгликольсукцинате, $t = 192^{\circ}\text{C}$	Лецитин		Этаноламинфосфатид		Серинфосфатид	
		Митохондрии	Микросомы	Митохондрии	Микросомы	Митохондрии	Микросомы
12:0	0,18	сл	сл	—	—	—	—
13:0	0,21	—	сл	—	—	—	—
14:0	0,32	0,4	0,4	сл	сл	сл	сл
15:0	0,41	сл	сл	—	—	сл	сл
16:0 (ДМА)	0,45	—	—	1,4	2,7	сл	сл
16:0	0,55	55,0	53,3	6,6	6,8	2,4	3,2
16:1	0,64	—	—	сл	—	сл	сл
17:0	0,74	—	—	—	—	сл	сл
18:0 (ДМА)	0,83	—	—	1,8	3,8	сл	сл
18:0	1,0	10,3	9,7	36,9	23,8	48,6	45,5
18:1	1,15	25,9	27,5	7,2	8,4	12,8	11,8
18:2	1,45	0,5	1,2	0,3	сл	0,3	сл
20:0	1,8	0,3	—	—	—	сл	—
20:1	2,1	—	0,8	—	—	сл	—
20:2	2,4	—	сл	—	—	—	—
20:3	2,78	—	сл	—	—	—	0,7
20:4	3,41	5,1	4,1	16,5	23,5	2,9	2,0
20:5	4,08	—	—	—	—	—	2,1
22:4	6,05	0,3	0,5	6,4	1,4	2,7	} 35,3
22:5	7,0	сл	1,0	7,6	9,8	9,8	
22:6	9,11	2,2	1,2	15,5	19,5	20,5	
насыщенные		66	63	47	37	51	49
ненасыщенные		34	36	54	63	49	52

\* В коде, применяемом для обозначения жирных кислот в таблицах, первая цифра соответствует числу углеродных атомов кислоты, вторая — числу двойных связей.

ляется стеариновая, а не пальмитиновая, как в лецитине. В состав этаноламинфосфатида входит значительно больше ненасыщенных кислот, чем в лецитин, причем основными ненасыщенными кислотами являются не моноеновые, а полиеновые с 20, 22 углеродными атомами, с 4, 5 и 6 двойными связями. Полиеновые кислоты в этаноламинфосфатиде митохондрий и микросом составляют до 50% от суммы всех жирных кислот. Отличительной чертой этого фосфолипида, по сравнению со всеми изученными, является высокое содержание арахидоновой кислоты (16% в митохондриях; 23% — в микросомах).



Жирнокислотный состав сфингомиаглина митохондрий и микросом серого вещества больших полушарий мозга кроликов  
(в % от суммы всех кислот)

Кислота	Средний относительный объем удерживания на диэтиленгликоль-сукцинате	Митохондрии	Микросомы
13:0	0,21	—	сл
14:0	0,32	0,4	сл
14:1	0,36	сл	сл
15:0	0,41	0,2	сл
15:1	0,47	сл	сл
16:0	0,55	15,5	22,3
16:1	0,64	сл	сл
17:0	0,74	сл	сл
17:1	0,85	сл	—
18:0	1,0	54,7	54,4
18:1	1,15	9,1	10,0
18:2	1,45	1,0	—
20:0	1,8	1,0	2,6
20:1	2,1	1,3	—
21:0	2,39	сл	—
22:0	3,2	2,4	1,7
22:1	3,46	1,5	—
23:0	4,02	4,5	5,6
23:1	5,1	0,4	—
24:0	5,7	1,8	сл
24:1	6,2	3,7	3,7
25:0	7,0	2,2	—
	насыщенные	83	86
	ненасыщенные	17	14

Как уже указывалось, в этой работе диэфирную и ацетальную формы этаноламинфосфатида определяли суммарно. По данным Эйхберга, Уиттейкера и Даусона (8), этаноламинфосфатид митохондрий мозга беднее ацетальными, чем этаноламинфосфатид микросом. В литературе имеются указания на то, что плазмалогенная форма этаноламинфосфатида мозга содержит только ненасыщенные кислоты (9). Из этих литературных данных следует, что при окончательном суждении о молекулярной специфичности этаноламинфосфатидов изученных субклеточных фракций необходимо иметь в виду различное соотношение в них диэфирной и ацетальной форм.

В серинфосфатиде митохондрий и микросом, также как и в этаноламинфосфатиде этих субклеточных фракций, основной кислотой является стеариновая. Она составляет около 45% от всех жирных кислот. Серинфосфатид, по сравнению с другими

изученными нами фосфолипидами, содержит очень мало пальмитиновой кислоты — всего 2—3%. По степени ненасыщенности серинфосфатид очень близок к этаноламинфосфатиду.

Сфингомиелин по жирнокислотному составу сильно отличается от других изученных фосфолипидов (табл. 2). Для сфингомиелина митохондрий и микросом характерно высокое содержание насыщенных кислот (свыше 80%) и полное отсутствие полиненасыщенных длинноцепочечных кислот. Все ненасыщенные кислоты, входящие в состав сфингомиелина, моноеновые. Следующей отличительной чертой сфингомиелина является наличие в нем длинноцепочечных жирных кислот, содержащих более 22 углеродных атомов: 23, 24 и 25. Основной насыщенной кислотой сфингомиелина, как митохондрий, так и микросом, является стеариновая кислота. Она составляет свыше 50% от суммы всех жирных кислот.

Сравнение полученных данных показывает, что каждый из изученных фосфолипидов митохондрий и микросом серого вещества больших полушарий мозга кроликов имеет свой определенный состав жирных кислот. Индивидуальность фосфолипидов по этому признаку создается разными путями. Например, глицерофосфатиды имеют в основном один и тот же набор жирных кислот, но количественное содержание их в каждом фосфолипиде (или точнее в семействе одноименных фосфолипидов) свое. С другой стороны, сфингомиелин отличается от других фосфолипидов качественным составом жирных кислот. В сфингомиелине, как уже указывалось, совершенно нет полиненасыщенных кислот, но имеются такие кислоты, которых нет в глицерофосфатидах.

Особенности жирнокислотного состава изученных фосфолипидов мозга кроликов в общих чертах присущи соответствующим фосфолипидам мозга крысы (10) и мозга человека (2).

Полученные данные показывают, что состав жирных кислот отдельных фосфолипидов, выделенных из столь различных по функции субклеточных образований, как митохондрии и микросомы, очень близок. Такой же результат был получен Бирани и Бартли (10) при изучении фосфолипидов митохондрий и микросом мозга крыс. Однако учитывая накопленные к настоящему времени данные, говорящие в пользу полифункциональности фосфолипидов (1), нельзя расценивать это сходство как показатель того, что фосфолипиды выполняют только структурную роль. Большое количество жирных кислот, обнаруживаемое в составе фосфолипидов мозга, свидетельствует о наличии множества разновидностей изученных фосфолипидов, каждая из которых, надо думать, выполняет свою функциональную роль. Можно предположить, что в специфических метаболических процессах, связанных с функцией клеточных органелл, принимают участие какие-то определенные разновидности «индивидуальных»

фосфолипидов, которые могут даже преобладать в данном субклеточном образовании. В то же время это преобладание не обязательно должно сказаться на сумме кислот, так как один и тот же суммарный результат можно получить в итоге сложения разных комбинаций жирных кислот. В литературе уже появляются данные о составе жирных кислот разновидностей «индивидуальных» фосфолипидов и об их обмене. Так, Коллинз (11) выделил из печени лецитины с разным жирнокислотным составом и установил, что лецитин, в состав которого входят пальмитиновая и арахидоновая кислоты, обменивается по  $R^{32}$  в 10 раз медленнее других разновидностей лецитина. Роу (12) удалось выделить из кровяных клеток человека этаноламинфосфатиды с разным составом жирных кислот и с различными скоростями обмена. Изучение жирнокислотных разновидностей «индивидуальных» фосфолипидов является дальнейшим углублением в химию фосфолипидов, которое необходимо для выяснения их роли в структуре и метаболизме клетки.

### Выводы

Лецитин, этаноламинфосфатид, серинфосфатид и сфингомиелин митохондрий и микросом серого вещества больших полушарий мозга кроликов имеют свой определенный состав жирных кислот.

Из изученных глицерофосфатидов лецитин — наиболее насыщенный фосфолипид. Он содержит 60% насыщенных кислот и 40% — ненасыщенных. Полиненасыщенных кислот в нем очень мало (около 7%).

В этаноламинфосфатиде больше половины кислот ненасыщенные. Среди ненасыщенных кислот преобладают полиненасыщенные с длиной углеродной цепочки в 20 и 22 атома и с 4, 5 и 6 двойными связями. На их долю приходится около 50% всех жирных кислот этаноламинфосфатида.

В серинфосфатиде половина кислот насыщенные и половина — ненасыщенные. Полиненасыщенные кислоты составляют 40% от всех жирных кислот.

Сфингомиелин митохондрий и микросом резко отличается от других фосфолипидов своим составом жирных кислот. Он содержит кислоты, с длиной углеродной цепочки свыше 22 углеродных атомов. Почти все жирные кислоты, начиная с 14 углеродных атомов и до 25, представлены насыщенными кислотами и соответствующими им моноеновыми кислотами. На долю насыщенных кислот приходится свыше 80%. Полиненасыщенных кислот в сфингомиелине нет.

Состав жирных кислот фосфолипидов, выделенных из митохондрий и из микросом, очень близок.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Крепс Е. М., Манукян К. Г., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Ченыкаева Е. Ю., Чирковская Е. В., Ж. эволюц. биохимии и физиол., **1**, 16, 1965.
2. O'Brien J. S., Fillerup D. L., Mead J. F., J. Lipid. Res., **5**, 329, 1964.
3. Hanahan D., Dittmer J., Warashina E., J. Biol. Chem., **228**, 685, 1957.
4. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г., Биохимия, **26**, 1027, 1961.
5. Stoffel W., Chu F., Ahrens E. H., Analyt. Chem., **31**, 307, 1959.
6. Woodford F. P., van Gent C. M., J. Lipid. Res., **1**, 188, 1960.
7. Farquhar J. W., Insull W., Rosen P., Stoffel W., Ahrens E. E., Nutrition Reviews (Supplement) **17**, Part II, 1, 1959.
8. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C., Biochem. J., **92**, 91, 1964.
9. Debuch H., Essential Fatty Acids, Ed. by H. M. Sinclair, London, 1958.
10. Biran L. A., Bartley W., Biochem. J., **79**, 159, 1961.
11. Collins F. D., Biochem. J., **88**, 319, 1963.
12. Rowe C. E., Biochem. J., **73**, 438, 1959.

## **СДВИГИ В СОДЕРЖАНИИ ГЛИКОЛИПИДОВ, ФОСФОЛИПИДОВ И ИХ ФРАКЦИЙ В МОЗГУ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХЛОРОПРЕНОВОМ ОТРАВЛЕНИИ И РЕНТГЕНООБЛУЧЕНИИ**

**В. Г. Мхитарян, Г. Е. Бадалян**

Кафедра биохимии Ереванского медицинского института, Ереван

В настоящее время доказано, что нервная система наиболее чувствительна к хлоропрену. Еще в 1956 году В. Г. Мхитаряном (9), а затем и А. В. Мнацаканяном (5) было установлено, что у белых крыс при хроническом хлоропреновом отравлении резко нарушается условно-рефлекторная деятельность.

Исследования Г. Мурадяна (6) показали, что у рабочих, занятых на производстве хлоропренового каучука, имеются изменения со стороны центральной нервной системы в виде токсического энцефаломиелита и энцефалопатии, а в ряде случаев и поражение спинного мозга.

Являясь липотропным ядом, хлоропрен оказывает определенное воздействие на липоидный обмен.

Известно, что нервная ткань наиболее богата липоидами и поэтому нарушения, наблюдаемые при хлоропреновом отравлении, выражены значительно сильнее со стороны нервной системы. В связи с этим представляет интерес изучение липоидного обмена в мозгу при хлоропреновом отравлении.

Среди липоидов мозга определенное место занимают гликолипиды — цереброзиды и ганглиозиды. В наших предыдущих исследованиях (11) было показано, что при хроническом хлоропреновом отравлении количество цереброзидов в мозгу увеличивается в основном за счет «свободной» фракции. Из литературных данных известно, что наблюдается обратная взаимосвязь между количественными сдвигами цереброзидов и муколипидов.

Исследования Э. Е. Мхехяна (7) показали, что при одно- и двусторонней экстирпации верхнего шейного симпатического узла увеличение цереброзидов в первые три дня после операции сопровождается понижением количества муколипидов, а в по-

следующие дни отмечается обратная картина. По данным А. А. Гарзуновой (2), при облучении животных рентгеновскими лучами количество гексозаминосодержащих веществ в мозгу понижается.

Наряду с гликолипидами в мозгу в достаточно большом количестве представлены также фосфолипиды, которые составляют почти половину всех липоидов мозга. Высокое содержание фосфолипидов в мозгу связано с тем, что они являются структурными элементами нервной ткани. Имеются данные о наличии тесной связи между обменом фосфолипидов и функциональным состоянием нервной системы (1, 4, 12, 13, 14, 15, 18, 21, 23, 25, 26, 27, 29).

Исходя из вышеизложенного, определенный интерес представляло изучение количественных сдвигов ганглиозидов и фосфолипидов в мозгу белых крыс при хроническом хлоропреновом отравлении, что и является предметом настоящего сообщения.

### Экспериментальная часть

Опыты были поставлены на 100 белых крысах обоего пола весом 200—250 г. Все крысы, кроме контрольных, подвергались динамической загрузке в течение 30, 90, 120 и 180 дней свежееотогнанным хлоропреном ингаляционным методом при расчетной концентрации хлоропрена в случае определения ганглиозидов 8 мг/л, а фосфолипидов — 4 мг/л.

Содержание «свободных» и «связанных» ганглиозидов определяли по методу М. Ш. Промыслова (6) и выражали «свободные» ганглиозиды по галактозе в мг/г сухого веса ткани и в мг/г сухого веса белка — в случае «связанных» ганглиозидов.

Таблица 1

Содержание «свободных» ганглиозидов, выраженное по галактозе в мг/г сухого веса ткани

	У контрольных крыс	У отравленных хлоропреном через			
		30 дней	90 дней	120 дней	180 дней
$M \pm m$	$1,27 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,10$	$0,86 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,03$
Предел колебания	$1,17 - 1,37$	$0,67 - 1,08$	$0,79 - 0,92$	$0,79 - 0,91$	$0,97 - 1,15$
	$n = 12$	$n = 8$	$n = 10$	$n = 10$	$n = 5$
		$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

Как видно из данных табл. 1, количество «свободных» ганглиозидов колеблется в пределах 1,23—1,37 и составляет в среднем  $1,27 \pm 0,02$  мг/г, что хорошо совпадает с литературными данными. Из этой же таблицы видно, что в результате хлоропренового отравления количество «свободных» ганглиозидов за-



метно уменьшается. Так, например, спустя 30 дней от начала отравления «свободные» ганглиозиды составляют  $0,86 \pm 0,04$  мг/г, что по сравнению с контролем меньше на 32,8%. Спустя 90 дней от начала отравления «свободные» ганглиозиды остаются на таком же низком уровне. При дальнейшем отравлении количество их снижается еще больше и на 120 день составляет  $0,83 \pm 0,02$  мг/г, что по сравнению с контролем меньше на 35,16%. Однако спустя 180 дней количество «свободных» ганглиозидов повышается, хотя продолжает оставаться ниже контрольных цифр на 16,4% ( $1,07 \pm 0,03$ ). «Связанные» ганглиозиды (табл. 2) в контрольных опытах составляют  $6,27 \pm 0,02$  мг/г веса сухих белков мозга и по сравнению со «свободным» их количество больше в пять раз. Из той же таблицы видно, что при хроническом хлоропреновом отравлении количество «связанных» ганглиозидов особым количественным изменениям не подвергается.

Таблица 2

Содержание «связанных» ганглиозидов, выраженное по галактозе в мг/г веса сухих белков мозга

	У контрольных крыс	У отравленных хлоропреном через			
		30 дней	90 дней	120 дней	180 дней
М $\pm$ m	$6,27 \pm 0,01$	$6,25 \pm 0,03$	$6,24 \pm 0,02$	$6,19 \pm 0,02$	$6,17 \pm 0,08$
Предел колебания	6,19—6,32	6,19—6,38	6,11—6,33	6,11—6,26	6,10—6,26
	n = 12	n = 8	n = 10	n = 10	n = 5
		P > 0,05	P > 0,05	P > 0,002	P > 0,1

В дальнейших исследованиях нам было интересно выявить сдвиги и в содержании фосфолипидов в мозгу. Для разрешения этого вопроса мы определяли содержание суммарных фосфолипидов и их отдельные фракции при тех же сроках отравления. Извлечение и отмывку липидов производили по методике, описанной А. А. Смирновым и Е. В. Чирковской (20). Хроматографическое разделение фосфолипидной смеси производили на бумаге, пропитанной кремневой кислотой, по методу Маринетти и Стоц (28), и количество суммарных фосфолипидов выражали в мкг Р на г сырой ткани, а отдельных фракций в процентах Р от Р суммы липидов.

На окрашенных родамином 6ж хроматограммах выявлялись семь пятен. 1-е пятно — дифосфоинозитид, 2-е — монофосфоинозитид, 3-е — сфингомиелин, 4-е — лецитин, 5-е — серинфосфатид, 6-е — этаноламинфосфатид и 7-е — полиглицерофосфатид.

В некоторых случаях выявлялось и восьмое пятно, что соответствует фосфатидной кислоте. Так как она находится в мозгу в очень малых количествах и обладает высокой обмениваемостью, то не всегда удается ее обнаружить.

Таблица 3

Количество суммарных фосфолипидов, выраженное в мкг Р/г сырой ткани

	У контрольных крыс	У отравленных хлоропреном через		
		30 дней	60 дней	120 дней
М ± m	1848,18 ± 9,40	1832,12 ± 20,5	1865,73 ± 5,70	1941,14 ± 10,90
Предел колебания	1783,99—1904,03 n = 12	1733,89—1930,81 n = 10 P > 0,5	1823,11—1895,98 n = 11 P > 0,5	1896,78—1994,23 n = 9 P < 0,001

Как видно из табл. 3, количество суммарных фосфолипидов у контрольных крыс составляет 1848,18 мкг Р/г сырой ткани. Спустя 30 и 60 дней от начала отравления суммарные фосфолипиды составляют соответственно 1870,16 и 1862,59 мкг Р/г, т. е. особым количественным изменениям не подвергаются. Спустя 120 дней от начала отравления отмечается некоторое статистически достоверное повышение (на 10,4%).

Если количество суммарных фосфолипидов особым количественным изменениям не подвергается, то отдельные фракции фосфолипидов претерпевают определенные изменения. Так, спустя 30 дней от начала отравления (см. табл. 4) наблюдается увеличение содержания фосфора дифосфоинозита, лецитина, полиглицерофосфатидов и уменьшение фосфора сфингомиелина, серинфосфатидов и этаноламинфосфатидов. Спустя 60 дней от начала отравления изменения носят почти такой же характер, как и при 30-дневном отравлении, но более выражены. Одновременно отмечается также увеличение монофосфоинозита и статистически не достоверное понижение этаноламинфосфатидов и полиглицерофосфатидов.

Спустя 120 дней до начала отравления (табл. 4) уменьшение фосфора сфингозинфосфатидов составляет 25,87% и фракции этаноламинфосфатидов — 13,69%. Увеличение серинфосфатидов статистически не достоверно. Наряду с этим отмечается увеличение содержания лецитинов в мозгу на 22,53%, инозитфосфатидов, как моно-, так и дифосфоинозита, — соответственно на 24,01 и на 26,08%.

Таким образом, если при хроническом хлоропреновом отравлении содержание суммарных фосфолипидов особым количественным изменениям не подвергается, то содержание их отдельных фракций подвергается определенным изменениям.

Содержание отдельных фосфолипидов в мозгу, выраженное в процентах  
Р от суммы Р липидов

№ пятна	Фосфолипиды	У контроль- ных	У отравленных хлоропреном через					
			30 дней		60 дней		120 дней	
				Изменение по сравнению с контролем в %		Изменение по сравнению с контролем в %		Изменение по сравнению с контролем в %
1	Дифосфоинозитид	2,42	2,82	+15,67	2,96	+23,51	2,859	+26,08
2	Монофосфоинозитид	5,27	5,68	+5,77	6,70	+28,36	6,225	+24,01
3	Сфингомиелин	12,33	9,206	-26,04	8,20	-32,84	8,714	-25,87
4	Лецитин	35,82	40,247	+11,36	42,14	+18,91	41,857	+22,53
5	Серинфосфатид	15,38	14,302	-7,82	12,13	-20,39	14,364	+1,93
6	Этаноламинфосф.	25,92	22,875	-12,51	24,48	-4,64	21,301	-13,69
7	Полиглицерофосф.	3,48	4,314	+22,73	3,40	-1,67	4,004	+20,64

Сдвиги, наблюдающиеся при хлоропреновом отравлении, в некоторой степени напоминают изменения в обмене веществ при рентгенооблучении. Причиной однотипных изменений, наблюдаемых при этих двух поражениях, являются липидные перекиси, которые накапливаются как при хлоропреновой интоксикации, так и при облучении организма рентгеновскими лучами. Липидные перекиси, как это явствует из теории, развиваемой Б. Н. Тарусовым (22), имеют большое значение в радиобиологических процессах.

Исследования В. Г. Мхитаряна (10) показали, что хлоропрен в каталитических количествах сокращает индукционный период самоокисления жиров, ускоряет разрушение каротиноидов, витамина А и приводит к резкому нарастанию перекисей в жирах. Подобные результаты были получены А. И. Журавлевым (3) и др. при облучении жиров рентгеновскими лучами. С. А. Шукур-ян (24) подтвердила эти данные и показала, что при хлоропреновом отравлении содержание липидных перекисей в ряде органов крыс, особенно в радиочувствительных, резко повышается. Она установила, что совместное действие хлоропрена и рентгенооблучения на организм приводит к еще большему накоплению перекисей, чем при действии их в отдельности.

В связи с тем, что многие биохимические сдвиги, наблюдаемые в организме как при хлоропреновом отравлении, так и при рентгенооблучении, в некоторой степени однотипные, нам было



Таблица 5

**Содержание «свободных» и «связанных» цереброзидов в мозгу белых крыс  
при однократном тотальном облучении**

	«Свободные» цереброзиды (в мг/г сырого веса)				«Связанные» цереброзиды (в мг/г сухого веса белка)			
	Контроль	Дни после облучения			Контроль	Дни после облучения		
		2-й	7-й	14-й		2-й	7-й	14-й
М ± m	6,69 ± 0,1	6,27 ± 0,25	5,16 ± 0,1	8,63 ± 0,18	14,63 ± 0,74	12,72 ± 0,43	12,35 ± 0,18	13,29 ± 0,31
Предел колебания	6,12—7,20	5,22—6,76	4,05—5,71	7,65—9,45	12,46—15,3	10,23—14,53	11,30—12,92	12,06—13,95
	n = 10	n = 10	n = 13	n = 11	n = 8	n = 10	n = 8	n = 9
		P > 0,1	P < 0,001	P < 0,001		P > 0,25	P < 0,02	P > 0,1

небезынтересно выяснить, подвергаются ли гликолипиды при тотальном облучении организма рентгеновскими лучами таким же изменениям, что и при хлоропроновом отравлении.

Опыты были поставлены на 140 крысах обоего пола весом 200—250 г. Часть крыс подвергалась однократному тотальному облучению на аппарате РУМ-11 при следующих технических условиях: напряжение — 190 кв, сила тока — 15 ма, кожно-фокусное расстояние — 40 см, фильтр — 0,5 мм меди + 0,1 мм алюминия, мощность дозы 30 р в минуту, общая доза облучения — 800 р. Другую часть крыс облучали при тех же условиях в течение месяца по 30 р в день, суммарная доза составляла 800 р.

В наших исследованиях мы определяли содержание «свободных» и «связанных» цереброзидов по методу Радина, видоизмененному М. Ш. Промысловым (17). Содержание «свободных» цереброзидов выражали в мг/г сырого веса ткани, а «связанных» — на сухой вес белка. Ганглиозиды определяли по методу М. Ш. Промysłова (как указано выше).

Содержание цереброзидов и ганглиозидов определяли на 2-й, 7-й и 14-й день после однократного тотального облучения и на 30-й день после хронического облучения. Полученные данные были статистически обработаны и в большинстве случаев оказались достоверными. Как видно из табл. 5, «свободные» цереброзиды у контрольных крыс составляют в среднем  $6,69 \pm 0,1$  мг/г, что хорошо совпадает с данными Э. Е. Мхейна (8). Из той же таблицы видно, что на 2-й день после однократного общего облучения количество «свободных» цереброзидов имеет тенденцию к понижению, что становится достоверным на 7-й день после облучения и по сравнению с контролем ниже на 23%. На 14-й же день после облучения количество «свободных» цереброзидов значительно повышается и составляет в среднем  $8,63 \pm 0,18$  мг/г, что по сравнению с контролем больше на 29%. Данные о содер-

Таблица 6

Содержание цереброзидов в мозгу белых крыс при хроническом рентгенооблучении

	«Свободные» цереброзиды (в мг/г сырого веса ткани)		«Связанные» цереброзиды (в мг/г сухого веса белка)	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
М $\pm$ m	$6,69 \pm 0,10$	$9,14 \pm 0,27$	$14,13 \pm 0,35$	$11,95 \pm 0,22$
Предел колебания	6,12—7,20 n = 10	8,51—11,14 n = 10 P < 0,001	12,46—15,30 n = 10	11,16—13,05 n = 10 P < 0,001

Таблица 7

**Содержание ганглиозидов в мозгу белых крыс при однократном тотальном облучении**

	«Свободные» ганглиозиды (в мг/г сухого веса ткани)				«Связанные» ганглиозиды (в мг/г сухого веса белка)			
	Контроль	Дни после облучения			Контроль	Дни после облучения		
		2-й	7-й	14-й		2-й	7-й	14-й
М ± m	1,28 ± 0,05	0,92 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,77 ± 0,04	6,31 ± 0,02	6,21 ± 0,05	6,32 ± 0,02	6,26 ± 0,01
Предел колебания	1,17—1,51	0,74—1,21	0,59—0,99	0,74—1,01	6,19—6,50	5,91—6,41	6,24—6,39	6,20—6,33
	n = 18	n = 10	n = 10	n = 10	n = 18	n = 10	n = 10	n = 10
		P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001		P > 0,1	P > 0,5	P > 0,02



жании «связанных» цереброзидов приведены в той же таблице. Как видно, содержание их у контрольных крыс составляет в среднем  $14,13$  мг/г. Из этой же таблицы видно, что «связанные» цереброзиды на 2-й день после облучения особым количественным изменениям не подвергаются, тогда как на 7-й день их содержание по сравнению с контролем ниже на  $12,7\%$ . Связанные цереброзиды на 14-й день хотя и немного повышаются, однако не достигают первоначального уровня.

При хроническом тотальном облучении в течение 30 дней (табл. 6) содержание «свободных» цереброзидов составляет в среднем  $9,14 \pm 0,27$  мг/г сырой ткани, что по сравнению с контролем больше на  $36,6\%$ . «Связанные» же цереброзиды несколько уменьшаются — по сравнению с контролем на  $15,5\%$ .

Определенный интерес представляет тот факт, что как при хлоропреновом отравлении, так и при рентгенооблучении содержание ганглиозидов в мозгу изменяется по сравнению с цереброзидами в противоположную сторону. Как видно из табл. 7, спустя двое суток после рентгенооблучения количество «свободных» ганглиозидов понижается и составляет  $0,92$  мг/г сухого веса ткани, что по сравнению с нормой ниже на  $28,1\%$ . В следующие сутки после облучения содержание их продолжает еще больше падать. Так на 7-й день они составляют  $0,81$  мг/г сухого веса ткани — содержание понижается на  $36,8\%$ , и, наконец, на 14-й день после облучения свободных ганглиозидов по сравнению с нормой меньше на  $39,9\%$ .

Содержание «связанных» ганглиозидов, как это видно из той же таблицы, остается без изменения не только на 2-й день после облучения, но и на 7-й и 14-й день.

Аналогичные данные были получены и при хроническом рентгенооблучении крыс в течение 30 суток по  $30$  р в день.

Как видно из табл. 8, содержание «свободных» ганглиозидов после 30-дневного облучения составляет в среднем  $0,94 \pm 0,04$

Таблица 8

Содержание ганглиозидов в мозгу белых крыс при хроническом тотальном облучении

	«Свободные» ганглиозиды (в мг/г сухого веса ткани)		«Связанные» ганглиозиды (в мг/г сухого веса белка)	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
$M \pm m$	$1,28 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,04$	$6,31 \pm 0,02$	$6,26 \pm 0,03$
Предел колебания	$1,17-1,51$ $n = 18$	$0,68-0,98$ $n = 14$ $P < 0,001$	$6,19-6,50$ $n = 18$	$6,03-6,50$ $n = 14$ $P > 0,1$

мг/г, что по сравнению с контролем ниже на 26,6%. При тех же условиях опыта содержание «связанных» ганглиозидов остается без изменения.

Таким образом, как при хлоропреновой интоксикации, так и при рентгенооблучении наблюдаются однотипные изменения в содержании цереброзидов и ганглиозидов.

## Выводы

1. У крыс при хроническом хлоропреновом отравлении содержание «свободных» ганглиозидов в мозгу спустя 30 и 90 дней от начала отравления снижается на 32,8%, а спустя 120 и 180 дней — соответственно на 35,16 и на 16,4%. При тех же условиях отравления содержание «связанных» ганглиозидов особым количественным изменениям не подвергается.

2. При хлоропреновом отравлении спустя 30 и 90 дней после отравления содержание суммарных фосфолипидов остается без изменения, а спустя 120 дней их количество увеличивается на 10,4%.

3. Увеличиваются фракции лецитинов, моно- и дифосфоинитолфосфатидов и полиглицерофосфатидов и уменьшаются фракции сфингозинфосфатидов, этаноламинфосфатидов и серинфосфатидов.

4. Тотальное однократное рентгенооблучение вызывает на 7-й день некоторое снижение содержания «свободных» цереброзидов и значительное повышение на 14-й день.

Содержание «связанных» цереброзидов на 2-й и 7-й день несколько снижается и доходит до нормы на 14-й день. При этих же условиях содержание «свободных» ганглиозидов понижается на 2-й, 7-й и 14-й день и остается ниже нормы на 39,9%. Содержание «связанных» ганглиозидов особым количественным изменениям не подвергается.

5. При хроническом рентгенооблучении количество «свободных» цереброзидов повышается на 36,6%, «связанных» же несколько снижается.

При тех же условиях содержание «свободных» ганглиозидов понижается на 26,6%, а «связанных» остается без изменения.

6. Установлена однотипность изменений содержания цереброзидов и ганглиозидов при хлоропреновом отравлении и рентгенооблучении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Г. Е., Иванова Т. Н., Правдина Н. И., Биохимия, 19, вып. 5, 578.
2. Гарзунова А. А., Автореф. канд. дисс., М., 1954.
3. Журавлев А. И., Автореф. канд. дисс., М., 1954.

4. Крепс Е. М., Смирнов А. А., Четвериков Д. А., Биохимия нервной системы, Киев, 125, 1954.
5. Мнацаканян А. В., Научная сессия ин-та эпидемиологии и гигиены, посвященная 40-летию установления Советской власти в Армении. Тезисы докладов, Ереван, 1960.
6. Мурадян В. Г., Ж. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова, 58, вып. 10, 1238, 1958.
7. Мхеян Э. Е., 3-я Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, 409, Ереван, 1963.
8. Мхеян Э. Е., Вопросы биохимии, Ереван, т. 3, 19, 1963.
9. Мхитарян В. Г., II Закавказский съезд физиол., биохим. и фармакол. Тезисы докладов, Тбилиси, изд. АН Груз. ССР, 168, 1960.
10. Мхитарян В. Г., Известия АН Арм. ССР (хим. науки), т. XI, 2, 109, 1958.
11. Мхитарян В. Г., Бадалян Г. Е., Труды Ереванского мед. ин-та. Вып. XIV, 1965.
12. Окунь М. И., Биохимия, 11, вып. 3, 580, 1937.
13. Осташков К. В., Биохимия, 26, вып. 4, 655, 1961.
14. Палладин А. В., Сб.: Биохимия нервной системы, 7, Киев, 1954.
15. Поверенный А. М., Ольштейн С. Е., Никольский В. В., Укр. биохим. ж., 25, 2, 127, 1953.
16. Промыслов М. Ш., Укр. биохим. ж., 34, 3, 451, 1962.
17. Промыслов М. Ш., Сб.: Биохимия нервной системы, Киев, 179, 1954.
18. Радкевич Р. А., Тр. ин-та туберкулеза АМН СССР, 27, 1, 40, 1953.
19. Смирнов А. А., ДАН СССР, 101, 5, 913, 1955.
20. Смирнов А. А., Чирковский Е. В., Сб.: Вопросы биохимии нервной системы. Изд-во АН Укр. ССР, Киев, 83, 1957.
21. Сквирская Э. Б., Сб.: Биохимия нервной системы, Киев, 36, 1954.
22. Тарусов Б. Н., Основы биологического действия радиоактивных излучений, М., 1954.
23. Четвериков Д. А., ДАН СССР., 105, 1300, 1955.
24. Шукурян С. А., Автореф. канд. дисс., Ереван, 1964.
25. Davison A. N., Wajda Martha, J. Neurochem., 9, 427, 1962.
26. Dawson R. M. C., Richter D., Proc. Roy. Soc., 137, 253, 1950.
27. Gerstl B., Kahnke M. J., Smith J. K., Tavaststjerna M. G., Hayman R. B., Brain, 84, 310, 1961.
28. Marinetti G. V., Stotz E., Biochim. Biophys. Acta, 21, 168, 1956.
29. Stricher E., Phosphorus metabolism, II, 798, 1952.



## ХАРАКТЕРИСТИКА ГАНГЛИОЗИДОВ И ЦЕРЕБРОЗИДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАСТУЩИХ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ГИПОКСИИ

Л. С. Романова, С. Ю. Туманова

Лаборатория биохимии нервной системы Института им. А. А. Ухтомского  
Ленинградского университета, Ленинград

Одной из особенностей головного мозга является его чрезвычайная чувствительность к кислородной недостаточности. Даже кратковременное отсутствие кислорода вызывает большие изменения в обмене как пластических, так и энергетических веществ головного мозга. Нарушения, происходящие при гипоксии в углеводном и энергетическом обмене изучены наиболее полно (1—5). В то же время очень мало сведений имеется о нарушениях пластических веществ при гипоксии, в частности липидов головного мозга. Поэтому проблема кислородного голодания постоянно привлекает к себе исключительное внимание исследователей.

Небезынтересно было проследить влияние гипоксии на обмен и поведение гликолипидов головного мозга. Ганглиозиды и цереброзиды — основные представители класса гликолипидов, играют в деятельности головного мозга важную роль. Ганглиозиды, являясь преимущественно мембранными компонентами серого вещества, обеспечивают в нейроне проведение нервных импульсов. Цереброзиды, входящие в состав мембранных элементов белого вещества и относящиеся к обкладочным веществам нейрона, изолируют нервные импульсы от иррадиации их в окружающую среду. Первые работы Лаудена и Вольфа (17—18) показали, что при гипоксии происходят необратимые изменения ганглиозидов, резко уменьшается их количество. И хотя механизм, которым гипоксия вызывает изменения в мембранных ганглиозидах, неясен, твердо установлено, что при гипоксии резко уменьшается число анионных групп ганглиозидов. Если на один нейрон приходится  $10^{11}$  карбоксильных групп ганглиозидов, то при гипоксии одна треть этих групп теряется.

Потеря анионных групп, локализованных в мембране нейрона, изменяет поведение ганглиозидов по отношению к катионам и частично объясняет изменение проницаемости нейронов после гипоксии. Так, Ли и Мак-Ильвейн (16) обнаружили депрессию мембранных потенциалов мозга в условиях гипоксии. Хильман (9) нашел, что некоторые клетки более чувствительны к недостатку кислорода, чем другие, и предположил, что эти клетки постоянно деполяризуются при гипоксии. Томсон и Мак-Ильвейн (22) показали, что добавление основных белков и связывание ими анионных групп ганглиозидов также вызывает деполяризацию клеток коры головного мозга. Эти клетки могут быть реполяризованы добавлением ганглиозидов. N-ацетилнейраминовая кислота является единственной кислотной группой в структуре ганглиозидов. Было показано, что устранение части нейраминовой кислоты мембранных ганглиозидов уменьшает или полностью ликвидирует отрицательный заряд этих мембран. Поэтому чувствительность мозговой ткани к гипоксии и необратимая природа гипоксических изменений может быть результатом устранения N-ацетилнейраминовой кислоты из ганглиозидов мембран. Кори и Штейн (13) сообщили о деградации ганглиозидов в анаэробных условиях постулируемым ферментом ганглиозидазой. Лауден и Вольф (18) также предполагают, что гипоксия освобождает ферментные активаторы или активирует мозговые гликолипидазы, приводящие к распаду ганглиозидов.

В последнее время появилась большая серия работ, свидетельствующая о гетерогенности гликолипидов головного мозга (10, 11, 13—15, 20, 21, 24).

В данной работе мы хотели проследить, как сказывается гипоксическое состояние на гетерогенности ганглиозидов и цереброзидов головного мозга, их количественном изменении и интенсивности обмена отдельных фракций исследуемых гликолипидов.

#### Постановка опытов

В наших опытах гипоксия вызывалась помещением животных в барокамеру на 1 минуту при остаточном давлении 90 мм рт. ст. В этих условиях происходит резкое замедление поступления кислорода, что немедленно сказывается на поведении животных. Сильное возбуждение сменяется судорогами, синюшностью, затрудненным дыханием. Опыты были поставлены на растущих животных 3-недельного возраста. Известно, что новорожденные и молодые животные отличаются большей устойчивостью к кислородной недостаточности по сравнению со взрослыми. Для взрослых животных выбранные нами условия гипоксии оказались летальными. Центральная нервная система растущих животных при гипоксии страдает меньше. В литературе есть указания на то, что слабые и средние формы гипоксии вызывают повышенное потребление кислорода взрослыми животными. В отличие от этого, у новорожденных даже при малых степенях гипоксии потребление кислорода падает (7).

## Методика

Ганглиозиды извлекались из хлороформ-метанолового экстракта липидов мозга, полученного методом Фолча (8) в модификации Свеннерхольма (19). Количество полученных ганглиозидов определялось по нейраминовой кислоте тиобарбитуровым методом (6).

Цереброзиды выделялись при обработке хлороформ-метанолового экстракта липидов трихлоруксусной кислотой и водой по методу Азмена (23) с последующей очисткой диализом и экстракцией ацетоном. Количественное содержание их определялось орциновым методом по галактозе (19, 1).

Ганглиозиды и цереброзиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле КСК, с размером частиц 200 меш, содержанием 5% гипса. Для разделения использовали систему растворителей хлороформ-метанол-вода (60:35:8). Хроматограммы проявляли парами йода.

## Результаты исследований и обсуждение

В условиях гипоксии нами наблюдалось снижение содержания как общего количества ганглиозидов, так и общего количества цереброзидов головного мозга. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Изменение содержания общего количества ганглиозидов и цереброзидов при гипоксии

Исследуемые гликолипиды	Содержание в мг%		Снижение в %
	Норма	Гипоксия	
Ганглиозиды	141	43	70
Цереброзиды	880	430	51

В таблицах 2 и 3 приведены величины значений  $R_f$  фракций цереброзидов и ганглиозидов головного мозга животных в норме и при гипоксии.

Таблица 2

Величины  $R_f$  фракций ганглиозидов головного мозга в норме и при гипоксии

№ фракции	Величины $R_f$ фракций	
	Норма	Гипоксия
1-я	$0,05 \pm 0,002$	$0,04 \pm 0,002$
2-я	$0,09 \pm 0,003$	$0,09 \pm 0,002$
3-я	$0,18 \pm 0,003$	$0,18 \pm 0,003$
4-я	$0,28 \pm 0,014$	$0,28 \pm 0,001$
5-я	$0,39 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$
6-я	$0,50 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$
7-я	$0,62 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,02$
8-я	$0,75 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,03$



Как видно из приведенной таблицы, число фракций ганглиозидов при гипоксии не уменьшалось. Несмотря на резкое снижение количества ганглиозидов и цереброзидов головного мозга при гипоксии, характер гетерогенности исследуемых гликолипидов не изменился. Эти наши данные находятся в некотором несоответствии с работой Лаудена и Вольфа (17). Авторы показали, что при гипоксии происходит уменьшение фракции со значением  $Rf = 0,06$  или ее полное исчезновение.

Таблица 3

Величины  $Rf$  фракций цереброзидов головного мозга в норме и при гипоксии

№ фракции	Величины $Rf$ фракций цереброзидов	
	Норма	Гипоксия
1-я	$0,47 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,04$
2-я	$0,57 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,02$
3-я	$0,65 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,01$
4-я	$0,77 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
5-я	$0,88 \pm 0,01$	$0,91 \pm 0,02$

Как видно из представленных результатов, гипоксическое состояние не сказывается существенно на картине гетерогенности цереброзидов головного мозга. Если качественная картина гетерогенности, судя по значениям  $Rf$  исследуемых гликолипидов, не претерпела существенных изменений, то небезынтересно было рассмотреть количественные изменения отдельных фракций при гипоксии.

Таблица 4

Изменение содержания отдельных фракций ганглиозидов при гипоксии

Фракции	Содержание в мг%		Снижение в %
	Норма	Гипоксия	
Грисialogанглиозиды	11	2,5	78
Дисialogанглиозиды	126	39	69
Моносialogанглиозиды	4	1,5	63

Как видно из приведенной таблицы, при гипоксии снижение количества ганглиозидов было примерно одинаковым в отдельных фракциях. Поэтому процентное соотношение между отдельными фракциями не изменилось и осталось близким к процентному отношению в норме, что видно из таблицы 5.

Таблица 5

Процентное соотношение основных фракций ганглиозидов в норме и при гипоксии

Фракции	% ганглиозидов	
	Норма	Гипоксия
Трисialogанглиозиды	2,5	3,6
Дисialogанглиозиды	90	92
Моносialogанглиозиды	7,5	4,7

В таблице 6 представлены данные по содержанию отдельных фракций цереброзидов головного мозга в норме и при гипоксии.

Таблица 6

Изменение содержания отдельных фракций цереброзидов при гипоксии

№ фракции	Содержание в мг%		Снижение в %
	Норма	Гипоксия	
1-я	118	59	50
2-я	139	58	58
3-я	186	73	61
4-я	257	105	59
5-я	179	138	23

Так как снижение количества цереброзидов в отдельных фракциях при гипоксии происходило в равной степени, что видно из таблицы 6, то процентное соотношение между отдельными фракциями не отличалось от соотношений в норме. Данные по процентному соотношению отдельных фракций цереброзидов в норме и при гипоксии представлены в таблице 7.

Таблица 7

Процентное соотношение отдельных фракций цереброзидов в норме и при гипоксии

№ фракции	% цереброзидов	
	Норма	Гипоксия
1-я	14	14
2-я	16	13
3-я	21	17
4-я	29	24
5-я	20	32

Далее нами исследовалась интенсивность обмена отдельных фракций у указанных гликолипидов головного мозга при гипоксии. В качестве источника синтеза исследованных гликолипидов был использован 2-С-<sup>14</sup>-ацетат. Ацетат вводился подкожно из расчета 30 микрокури на 100 грамм веса животного. Продолжительность радиоактивной экспозиции в наших опытах была один час. Данные по изменению удельной активности отдельных фракций ганглиозидов и цереброзидов при гипоксии представлены в таблицах 8 и 9.

Таблица 8

Удельная активность отдельных фракций ганглиозидов в норме и при гипоксии при введении 2-С<sup>14</sup>-ацетата  
(средние данные из 8 опытов)

Фракции	Удельная активность в имп/мин · мг	
	Норма	Гипоксия
Трисialogанглиозиды	546	398
Дисialogанглиозиды	328	233
Моносialogанглиозиды	1065	300

Из приведенных данных видно, что при гипоксии наблюдается резкое снижение интенсивности включения радиоактивной метки в отдельные фракции ганглиозидов, особенно резко снижается удельная активность моносialogанглиозидов.

Удельная активность отдельных фракций цереброзидов вообще значительно ниже удельной активности ганглиозидов, что лишний раз подчеркивает различную физиологическую значимость исследуемых гликолипидов в деятельности центральной нервной системы. Замедление синтеза изучаемых гликолипидов головного мозга при гипоксии может быть объяснено усилением распада данных гликолипидов.

Таблица 9

Удельная активность отдельных фракций цереброзидов в норме и при гипоксии при введении 2-С<sup>14</sup>-ацетата

№ фракции	Удельная активность в имп/мин · мг.	
	Норма	Гипоксия
1-я	15	3
2-я	20	11
3-я	18	8
4-я	36	21
5-я	18	6



## Выводы

При гипоксии в головном мозгу 3-недельных крыс содержание ганглиозидов и цереброзидов резко снижается. Процентное соотношение отдельных фракций изучаемых гликолипидов при гипоксии существенно не изменяется. Интенсивность включения радиоактивного ацетата в отдельные фракции ганглиозидов и цереброзидов при гипоксии резко снижается.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалова М. А., Прохорова М. И., Сб.: Нервная система, вып. 5, 3, 1964.
2. Прохорова М. И., Научный бюллетень ЛГУ, 28, 1951.
3. Прохорова М. И., Бродская Н. И., Соколова Г. П., Вопросы мед. химии, 3, вып. 4, 279, 1957.
4. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, 1965.
5. Соколова Г. П., Канд. дисс., ЛГУ, 1962.
6. Туманова С. Ю., Сб.: Нервная система, вып. 5, 22, 1964.
7. Лауэр Н. В., Колчинская А. З., Туранов В. В., Сб.: Кислородная недостаточность, 147, 1963.
8. Folch J. J., Ascoli M., Meath J., Lees M., le Baron F. N., J. Biol. Chem., 191, 833, 1951.
9. Hillman H. H., J. Neurochem., 8, 257, 1961.
10. Johnson G. A., McCluer R. H., Biochim. Biophys. Acta, 70, 4, 487, 1963.
11. Jatzkewitz H., Mehl E., Z. physiol. Chem., 320, 3, 251, 1960.
12. Korey S., Gonatas J., Life Sciences, 5, 296, 1963.
13. Korey S., Stein A., Fed. Proc., 21, 283, 1962.
14. Kuhn R., Wiegandt H., Egge H., Angew. Chem., 73, 16, 580, 1961.
15. Kuhn R., Wiegandt H., Z. Naturfor., 18b, 7, 541, 1963.
16. Li C. H., McIlwain H., J. Physiol., 139, 178, 1957.
17. Lowden J. A., Wolfe L. S., Nature, 197, 4869, 771, 1963.
18. Lowden J. A., Wolfe L. S., Canad. J. Biochem., 42, 12, 1703, 1964.
19. Svennerholm L., J. Neurochem., 1, 1, 42, 1956.
20. Svennerholm L., J. Neurochem., 10, 9, 613, 1963.
21. Svennerholm L., J. Lipid. Res., 5, 145, 1964.
22. Thomson C. C., McIlwain H., Biochem. J., 79, 342, 1961.
23. Uzman L. L., J. Biol. Chem., 1953.
24. Wherrett J. R., Cumings J. N., Biochem. J., 86, 2, 378, 1963.

## ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ГЛИКОГЕНА МОЗГА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ГЛИКОГЕНООБРАЗОВАТЕЛЕЙ

З. Н. Тупилова, В. А. Вилкова, А. М. Корвацкая

Лаборатория биохимии нервной системы и обмена веществ Физиологического института Ленинградского государственного университета, Ленинград

Применение изотопного метода в исследованиях гликогена мозга позволило выявить роль этого важного биологического полимера в ЦНС и поставило его в ряд веществ, принимающих активное участие в процессах метаболизма нервной клетки.

С помощью радиоактивного углерода ( $C^{14}$ ) впервые установлена высокая степень обновления гликогена мозга (1) по сравнению с гликогеном других органов (2), а также зависимость интенсивности его синтеза от функционального состояния ЦНС (3—6).

Принципиально новым явилось установление факта резкого снижения интенсивности процессов синтеза гликогена мозга при наркотическом торможении, являющегося одним из проявлений общего снижения обмена веществ в нервной клетке при наркозе.

Действие наркотиков и стимуляторов на синтез гликогена оказывается настолько сильным, что нормальный уровень его не восстанавливается даже спустя несколько часов после введения альтерирующих агентов (7).

Таким образом, первое изучение синтеза гликогена мозга, проведенное с применением глюкозы- $C^{14}$ , показало, что этот процесс является очень чувствительным ко всякого рода воздействиям. В связи с этим представляет интерес выяснение возможности использования дополнительных источников синтеза гликогена, таких как уксусная и молочная кислоты.

Целью настоящего исследования явилось дальнейшее изучение вопроса о синтезе гликогена мозга при различных функциональных состояниях организма с использованием в качестве гликогенообразователей ацетата- $l-C^{14}$  и лактата- $l-C^{14}$ .

Изучалась динамика проникновения меченых соединений в большие полушария мозга и интенсивность включения их в гликоген в норме, при наркотическом сне, вызванном введением хлоралгидрата, под действием кофеина, а также в условиях инсулиновой гипогликемии.

### Постановка опытов

Исследования проводились на белых крысах. Радиоактивные источники вводились подкожно из расчета 20—30 мккюри на 100 г веса животного и, как правило, одновременно с веществами, вызывающими те или иные изменения в функциональной деятельности мозга. При этом хлоралгидрат вводили в дозе 50 мг, кофеин — 50 мг, инсулин — 2 ед. на 100 г веса животного.

Через нужные промежутки времени живогных замораживали в жидком кислороде, декапитировали, полушария изолировали и тщательно растирали в ступке до порошкообразного состояния. Обработанная таким образом ткань служила исходным материалом для определения активности гликогена, глюкозы, молочной кислоты и гомогената. Одновременно в параллельных навесках порошка ткани производилось определение количества этих веществ в мозгу. Осаждение гликогена производилось по методу Керра (8) с последующим определением глюкозы в гидролизате гликогена феррицианидным методом или методом Нельсона (9). Молочная кислота определялась методом Баркера и Саммерсона (9). Определение активности гликогена производилось путем счета числа импульсов осадка гликогена, полученного методом Керра. Активность глюкозы и молочной кислоты — соответственно в осадке глюкозы и лактата цинка, полученных из спиртового экстракта ткани согласно указаниям Драри и Уика (10). В ряде случаев активность глюкозы определялась в осадке глюкозаона (9, 11). Счет числа импульсов производился в установке «Волна» с помощью торцового счетчика Т-25БФ.Л. Подробное описание определения количества исследуемых веществ и их активности дано в руководствах Прохоровой и Туниковой (9, 11).

### Результаты исследования

#### 1. Опыты с ацетатом- $1-C^{14}$

В первой серии опытов с ацетатом- $1-C^{14}$  исследовалась скорость появления радиоактивной метки ацетата в гликогене больших полушарий мозга. Как видно из графика (рис. 1), метка  $C^{14}$  в гликогене обнаруживается сразу же после введения ацетата. Уже через 5 минут У. А. гликогена составляет хорошо определяемую величину (106 имп/мин · мг), через 15 мин она возрастает до 298 имп/мин и к 30 минутам достигает максимума (499 имп.), а затем начинает снижаться и через 60 минут составляет около 40% максимальной величины (206 имп.). Таким образом, кривая изменения У.А. гликогена при введении ацетата- $1-C^{14}$  имеет ясно выраженный максимум. В то же время кривая изменения У.А. гомогената имеет пологий вид с небольшим подъемом через 15—30 минут после введения ацетата. Сравнение этих кривых говорит в пользу активного включения ацетата в гликоген мозга.



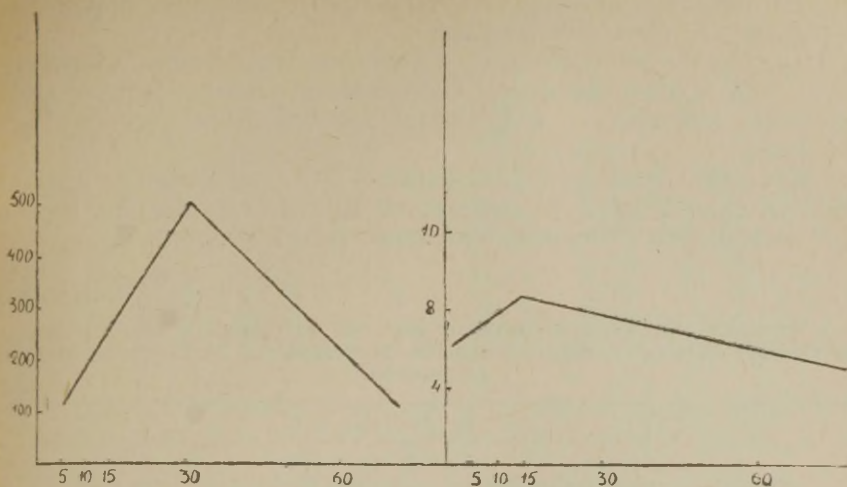


Рис. 1. Динамика изменения У.А. гликогена и гомогената больших полушарий мозга после введения ацетата-1- $C^{14}$ .  
Оси ординат — левая — У.А. гликогена (в имп/мин/мг), правая — У.А. гомогената. Ось абсцисс — время (в мин).

Кроме выяснения динамики включения ацетата в гликоген больших полушарий мозга изучалось также изменение интенсивности синтеза гликогена из ацетата-1- $C^{14}$  при различных сдвигах в функциональной деятельности мозга.

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что У.А. гликогена уменьшается при усиленном возбуждении, вызванном вве-

Таблица 1

Удельная активность гликогена больших полушарий в норме и при различных сдвигах в функциональной деятельности мозга после введения ацетата-1- $C^{14}$

Норма	У.А. (в имп/мин · мг)		
	Инсулин	Хлоралгидрат	Кофеин
200,0	56,7	83,5	128,0
109,5	63,2	149,6	123,0
252,0	46,0	164,0	89,0
335,0	77,7	83,0	78,0
227,0	92,5	73,5	42,5
279,0	56,7		
280,0	65,0		
	98,0		
$240,4 \pm 28,1$	$63,7 \pm 6,1$	$110,7 \pm 19,0$	$92,1 \pm 15,6$

дением кофеина, при наркотическом сне и особенно значительно в результате введения инсулина.

При наркотическом сне, вызванном введением хлоралгидрата, У.А. гликогена мозга уменьшается почти в 2 раза, после введения кофеина — в 2,5 раза, при действии инсулина — в 3,5 раза.

Наблюдаемые нами изменения в У.А. гликогена не стоят в прямой зависимости от активности гомогената, так как последняя уменьшается значительно менее резко (таблица 2).

Таблица 2

Удельная активность гомогената больших полушарий в норме и при различных сдвигах в функциональной деятельности мозга после введения ацетата-1-С<sup>14</sup>

У.А. (в имп/мин · мг)			
Норма	Инсулин	Хлоралгидрат	Кофеин
3,3	5,2	7,8	3,4
7,8	6,1	5,0	3,2
6,1	7,0	4,8	3,5
8,5	5,3	3,4	4,2
5,6	6,1		
5,6	8,5		
7,2	7,8		
4,5	5,8		
5,2			
$5,98 \pm 0,17$	$5,85 \pm 0,4$	$5,25 \pm 0,92$	$3,6 \pm 0,23$

Под действием инсулина активность гомогената вообще не изменяется, во время наркотического сна она уменьшается на 20% и только при кофеине имеет место значительное снижение У.А. гомогената — на 37%.

В случае кофеина и инсулина изменения в У.А. гликогена оказываются еще более резкими при вычислении величин общей активности гликогена \* мозга, так как количество его уменьшается при этих воздействиях.

Сравнительные данные по общей активности гликогена и гомогената представлены на рис. 2, из которого со всей очевидностью следует, что изменения в У.А. гликогена носят самостоятельный характер. Они свидетельствуют о резком снижении интенсивности синтеза гликогена из ацетата-1-С<sup>14</sup> при исследуемых функциональных сдвигах в деятельности мозга.

\* Под общей активностью гликогена мы понимаем активность, отнесенную к количеству его, содержащемуся в 1 г ткани мозга.

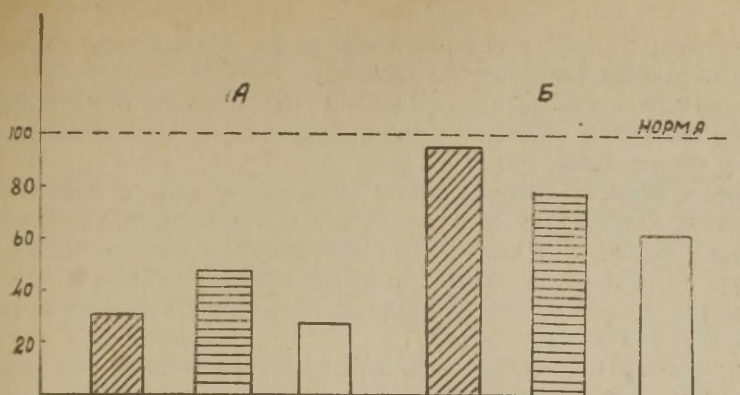


Рис. 2. Общая активность гликогена и гомогената больших полушарий мозга после введения инсулина, хлоралгидрата и кофеина (опыты с ацетатом-1-С<sup>14</sup>).

Ось ординат — % к норме. Инсулин — косая штриховка, хлоралгидрат — горизонтальная штриховка, кофеин — без штриховки. А — гликоген, Б — гомогенат.

## 2. Опыты с лактатом-1-С<sup>14</sup>

Обмен молочной кислоты в мозгу изучен в основном в плане количественных изменений, являющихся результатом уменьшения или увеличения интенсивности гликолиза при различных воздействиях на организм (12—23). Эта сторона вопроса настолько хорошо выяснена, что содержание молочной кислоты в мозгу может являться тестом при определении того или иного функционального состояния органа.

Вопрос о молочной кислоте как об одном из возможных источников синтеза гликогена мозга является почти не изученным. Вместе с тем, по количеству молочная кислота могла бы являться довольно солидным дополнительным к глюкозе источ-

Таблица 3

Удельная активность молочной кислоты, глюкозы и гликогена больших полушарий мозга в различные сроки после введения лактата-1-С<sup>14</sup>

	Удельная активность (в имп/мин · мг)						
	5	15	30	60	120	180	240
	(минуты после введения лактата-1-С <sup>14</sup> )						
Молочная кислота	2690	4960	13730	6279	2625	1223	405
Глюкоза	192	700	1545	2300	1310	361	178
Гликоген	9	75	161	294	327	190	144



ником гликогенообразования в мозгу. Ее содержание составляет около половины количества глюкозы.

В самом начале исследования мы столкнулись с фактом весьма быстрого проникновения лактата-1- $C^{14}$  в большие полушария мозга (табл. 3).

Уже в первые минуты после введения меченого лактата У.А. молочной кислоты в мозгу составляет довольно значительную величину (2690 имп/мин·мг); к 30 минутам она достигает максимума (13730 имп.), затем довольно резко падает и через час равняется половине максимальной величины, а спустя 4 часа — всего 1/33 части ее.

Радиоактивная метка обнаруживается также в глюкозе, но в значительно меньшем количестве. Через 5 мин. У.А. глюкозы составляет 7% по отношению к активности молочной кислоты. Максимум нарастания величины У.А. глюкозы приходится на

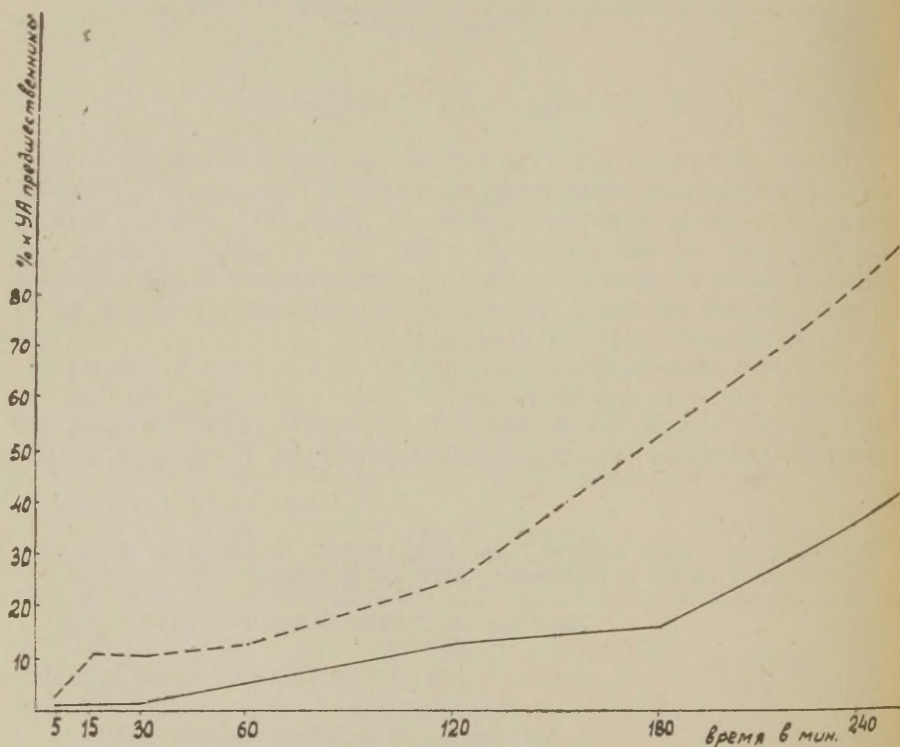


Рис. 3. Динамика изменения величины О.У.А. гликогена после введения лактата-1- $C^{14}$ .

Ось ординат — % к У.А. предшественника; ось абсцисс — время (в мин.). Сплошная линия — О.У.А.  $\frac{\text{гликоген}}{\text{молочная кислота}}$ ; пунктирная линия — О.У.А.  $\frac{\text{гликоген}}{\text{глюкоза}}$ .

60-ю мин. после введения лактата-1-С<sup>14</sup> и составляет уже 37% уровня активности молочной кислоты. К 4-му часу после введения лактата У.А. глюкозы достигает 44% активности молочной кислоты.

Включение лактата-1-С<sup>14</sup> в гликоген в первые минуты после введения является незначительным. Во время достижения максимального уровня активности молочной кислоты У.А. гликогена едва превышает 1%. В последующие сроки имеет место нарастание У.А. гликогена с максимумом ко 2-му часу после введения меченого лактата. К 4-му часу, когда У.А. молочной кислоты становится незначительной, У.А. гликогена составляет уже 36% ее активности (рис. 3). Значительно более высокими являются величины У.А. гликогена, рассчитанные в процентах к активности глюкозы (рис. 3).

Следовательно, на пути синтеза гликогена из молочной кислоты важную роль играет превращение ее в глюкозу.

Исследуя далее изменение У.А. гликогена при наркозе и возбуждении, мы обнаружили значительное уменьшение ее. На рис. 4 представлены данные изменения общей активности молочной кислоты, глюкозы и гликогена, выраженные в процентах к норме.

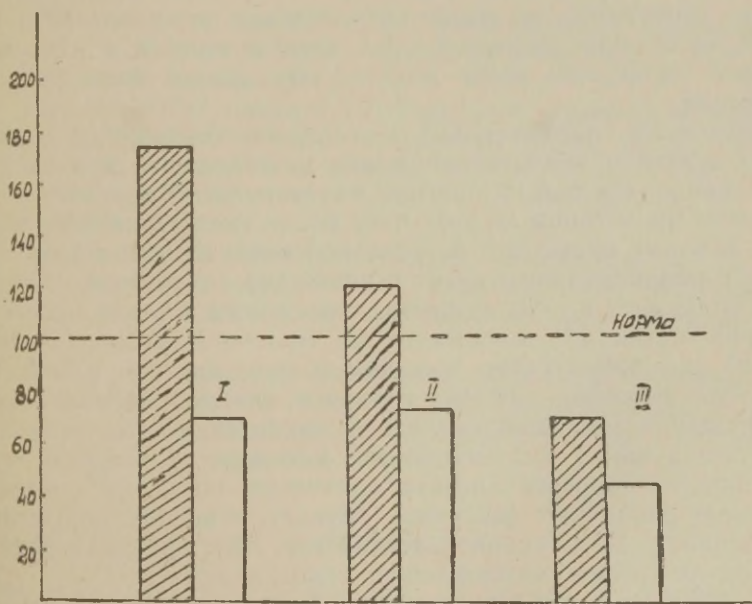


Рис. 4. Изменение общей активности молочной кислоты, глюкозы и гликогена при наркозе и возбуждении (опыты с лактатом-1-С<sup>14</sup>). Ось ординат — % к норме. I — молочная кислота; II — глюкоза; III — гликоген. Наркоз — косая штриховка, возбуждение — без штриховки.

При возбуждении, вызванном кофеином, имеет место небольшое снижение общей активности гликогена, сопровождаемое уменьшением активности глюкозы и молочной кислоты.

При наркотическом сне, вызванном введением хлоралгидрата, наряду со снижением общей активности гликогена имеет место небольшое увеличение активности глюкозы и резкое увеличение активности молочной кислоты.

Радиоактивная метка усиленно накапливается в молочной кислоте мозга. Общая активность ее возрастает на 70% по сравнению с нормой (рис. 4). И вместе с тем включение молочной кислоты в гликоген является заторможенным.

### Обсуждение результатов

В настоящем исследовании приводятся материалы изучения интенсивности синтеза гликогена из отдаленных предшественников, какими являются уксусная и молочная кислоты с применением ацетата-1- $C^{14}$  и лактата-1- $C^{14}$ .

В результате исследования установлена зависимость интенсивности синтеза гликогена мозга от характера гликогенообразователя и от функционального состояния ЦНС животного. Показано отчетливое, но менее значительное по сравнению с глюкозой, включение ацетата-1- $C^{14}$  в гликоген мозга, с ясно выраженным сдвинутым влево максимумом кривой изменения У.А. гликогена.

Включение лактата-1- $C^{14}$  в гликоген больших полушарий мозга является значительно менее интенсивным, кривая динамики изменения У.А. гликогена имеет пологий характер с максимумом нарастания ко 2-му часу после введения меченого лактата. К этому времени У.А. молочной кислоты уже намного снижена и радиоактивную метку в гликогене, по-видимому, следует отнести за счет других веществ, в частности, за счет глюкозы, в которой метка  $C^{14}$  появляется из молочной кислоты намного раньше и в значительно большем количестве, чем в гликогене.

Таким образом, глюкоза является важным звеном на пути превращения молочной кислоты в гликоген мозга.

Предыдущими исследованиями установлена большая чувствительность процесса синтеза гликогена мозга из глюкозы к действию различных факторов, обуславливающих нарушение в деятельности ЦНС (наркотический сон, действие аминазина, гипоксия, усиленное возбуждение, гипогликемия).

В настоящей работе этот факт констатирован и в отношении синтеза гликогена из отдаленных предшественников — уксусной и молочной кислот. Это делает синтез гликогена в мозгу чрезвычайно ранним процессом, основным звеном нарушений которого является, по-видимому, превращение в глюкозу.



Интересно, что заторможенность интенсивности синтеза гликогена мозга из лактата- $1\text{-C}^{14}$ , наблюдаемая нами при наркотическом сне, имеет место на фоне огромного избытка меченого лактата. В то же время степень радиоактивности глюкозы при наркозе увеличивается всего на 20% (рис. 4). Следовательно, новообразование гликогена из лактата- $1\text{-C}^{14}$  и в условиях наркоза нарушается, по-видимому, также на стадии образования глюкозы.

Обычно наблюдаемое при наркозе увеличение количества глюкозы и уменьшение количества молочной кислоты в мозгу можно объяснить только понижением интенсивности процесса распада углеводов. Таким образом, положение о том, что наркотическое торможение характеризуется общим снижением уровня обмена веществ в нервной клетке, находит свое подтверждение и в результатах настоящего исследования.

### Выводы

1. Изучалась интенсивность синтеза гликогена мозга из ацетата- $1\text{-C}^{14}$  и лактата- $1\text{-C}^{14}$  при различных функциональных состояниях ЦНС.

2. При введении ацетата- $1\text{-C}^{14}$  радиоактивная метка обнаруживается в гликогене сразу же после введения, и к 30 минутам достигает максимума.

3. При введении лактата- $1\text{-C}^{14}$  меченый углерод обнаруживается в гликогене больших полушарий мозга только спустя 30 минут и то в небольших количествах; У.А. гликогена достигает максимума лишь спустя 2 часа и лежит на очень низком уровне активности.

4. Интенсивность синтеза гликогена из ацетата- $1\text{-C}^{14}$  и лактата- $1\text{-C}^{14}$  резко уменьшается при наркотическом сне, усиленном возбуждении и в условиях инсулиновой гипогликемии (ацетат- $1\text{-C}^{14}$ ).

5. Таким образом, при различных сдвигах функциональной деятельности ЦНС синтез гликогена мозга нарушается не только из глюкозы, но и из отдаленных предшественников, какими являются уксусная и молочная кислоты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Прохорова М. И., Сб.: Биохимия нервной системы, Киев, 87, 1954.
2. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Сб.: Вopr. биохимии нервной системы, Киев, 118, 1957.
3. Прохорова М. И., Бродская Н. И., Соколова Г. П., Вopr. мед. химии, 111, 279, 1957.
4. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Radioisotopes in Scientific Research. Pergamon Press, London, New-York, Paris, 1958.

5. Тупикова З. Н., Новикова З. В., Корвацкая А. М., Сб.: Нервная система, ЛГУ, 8, 1966.
6. Вилкова В. А., Тупикова З. Н., Сб.: Нервная система, 7, 1966.
7. Тупикова З. Н., Корвацкая А. М., Сб.: Нервная система, ЛГУ, 5, 1964.
8. Kerr S. E., J. Biol. Chem., 116, 1, 1936.
9. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Л., 1965.
10. Drury D. R., Wick A. N., Amer. J. Physiol., 184, 304, 1956.
11. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Методы определения радиоактивного углерода, Л., 1959.
12. Владимирова Е. А., Сб.: Опыт исследования нервно-гуморальных связей, ВИЭМ, 3, 35, 1937.
13. Stone W. E., Biochem. J., 32, 1908, 1938.
14. Richter D., Dawson R. M. C., Amer. J. Physiol., 154, 733, 1948.
15. Chance M. K. A., Yaxley D. E., J. Biol. Chem., 27, 311, 1950.
16. Палладин А. В., Биохимия, 17, 356, 1952.
17. Владимиров Г. Е., Баховские чтения, IX, М., 1954.
18. McIlwain N., Tresize M., Biochem. J., 63, 250, 1956.
19. Тупикова-Казимирова З. Н., Вестник ЛГУ, 3, 101, 1957а.
20. Тупикова-Казимирова З. Н., Уч. зап. ЛГУ, 222, 286, 1957б.
21. Тупикова З. Н., Сб.: Нервная система, ЛГУ, 2, 31, 1960.
22. Тупикова З. Н., Сб.: Нервная система, ЛГУ, 6, 11, 1965.
23. Bolard B. M., McIlwain N., Biochem. J., 66, 651, 1957.

## ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И ГЛИКОГЕНА МОЗГА В РАЗНЫЕ СРОКИ ЭКСПОЗИЦИИ С 1-С<sup>14</sup>-ГЛИЦИНОМ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА

М. Н. Яковлева, Е. Ф. Иваненко

Кафедра биохимии Ленинградского государственного университета  
им. А. А. Жданова, Ленинград

Не вызывает сомнений большой познавательный интерес и практическое значение исследований, направленных на изучение особенностей обмена аминокислот в мозгу и влияние на этот процесс глюкотропных гормонов коры надпочечников. Вместе с тем, эти вопросы далеки от своего экспериментального разрешения. Имеющиеся в литературе сведения касаются главным образом печени, но и они полны противоречий.

Известно, что глюкотропные гормоны коры надпочечников повышают активность некоторых трансаминаз печени и тем самым обеспечивают освобождение безазотистого скелета аминокислот, например, пировиноградной кислоты из аланина для синтеза углеводов (1—4 и др.). Вместе с тем, имеются работы, свидетельствующие о стимулирующем действии гидрокортизона на активность глютамикопируватферазы в печени (5—8 и др.) и о падении этой активности при адrenaлэктомии (9).

Некоторые авторы отмечают увеличение количества гликогена в печени под влиянием кортикостероидов у интактных крыс (10—16) и собак (17) и у адrenaлэктомированных животных (18—21). Вместе с тем, другие авторы указывают на значительное снижение гликогена под влиянием кортизона и гидрокортизона в печени как интактных (22), так и адrenaлэктомированных крыс (23), а Petersen и сотрудники (24) считают, что адrenaлэктомия не влияет на гликоген печени.

Исследований, касающихся этих процессов в мозговой ткани, еще меньше и они также неоднородны по своим результатам. Так Chance и др. (25) отмечают, что кортикостероиды не оказывают влияния на количество гликогена мозга белых мышей,



Rosen и сотрудники (4) считают, что гидрокортизон лишь слабо увеличивает активность глютамино-аланиновой аминотрансферазы мозга, а по данным Potop и др. (26) кортизон вызывает повышение количества гликогена в мозгу.

Таким образом, в доступной нам литературе имеются либо косвенные доказательства (активность трансаминаз) стимулирующего влияния глюкокортикоидов на превращение аминокислот в углеводы, либо противоречивые данные, основанные на количественных сдвигах гликогена в тканях при воздействии глюкокортикоидных гормонов коры надпочечников. Для решения этих вопросов очень важным является применение методов изотопной индикации.

Задачей нашего исследования было изучить интенсивность обмена глюкозы и гликогена мозга через 1, 2 и 4 часа после инъекции 1-С<sup>14</sup>-глицина и воздействие на этот процесс гидрокортизона.

#### Постановка опытов и методы исследования

Нами были проведены две серии опытов. В первой из них исследовалось влияние сроков экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином на интенсивность обмена глюкозы и гликогена головного мозга, а во второй изучалось воздействие на этот процесс адrenaлэктомии и последующего введения гидрокортизона.

В первой серии опыты ставились на интактных крысах весом 150—180 г, которым подкожно вводилось 30 мккюри 1-С<sup>14</sup>-глицина, через 1, 2 и 4 часа животные замораживались в жидком воздухе. После разделки их тушки извлекалась ткань больших полушарий мозга для определения в ней содержания и У.А. глюкозы и гликогена, а также общей радиоактивности гомогената. С этой целью применялись методы, разработанные и описанные М. И. Прохоровой и З. Н. Тупиковой (27). Скорость обмена углерода глюкозы и гликогена выражалась величинами удельной радиоактивности, равной числу имп/мин в расчете на 1 мг углерода вещества (У.А<sub>с</sub>), а также на углерод вещества, содержащего в 1 г ткани (У.А<sub>1</sub>). Наряду с этим представлены величины относительной удельной активности (О.У.А.), за которую принималось отношение

$$\text{О.У.А.} = \frac{\text{имп/мин} \cdot \text{мг «С» вещества}}{\text{имп/мин} \cdot \text{мг «С» гомогената}}.$$

О.У.А. позволяет судить о доле активности углерода глюкозы и гликогена в общей радиоактивности углерода гомогената.

Во второй серии опытов крысы того же веса были разделены на три группы: ложнооперированные, адrenaлэктомированные без гидрокортизона и адrenaлэктомированные, получавшие гидрокортизон.

Первая группа — ложнооперированные крысы, подвергавшиеся такому же оперативному вмешательству, как и адrenaлэктомированные, с той лишь разницей, что у них не удалялись надпочечники. Эти животные служили контролем для крыс второй группы.

Вторая группа — адrenaлэктомированные животные, не получавшие гормона. На них изучалось влияние удаления надпочечников, и полученные в этом случае результаты использовались в качестве контроля к показателям, характеризующим воздействие гидрокортизона.

Третья группа — адrenaлэктомированные крысы (с удаленными надпочечниками), которым однократно, на 4 часа, вводился внутримышечно гидрокортизон в дозе 12,5 мг на 100 г веса. На этих животных изучалось

влияние гидрокортизона на интенсивность включения радиоактивной метки аминокислоты в глюкозу и гликоген.

Как контрольные, так и опытные животные через 4 дня после оперативного вмешательства и 20-часового голодания получали на 4 часа 30 мккюри 1-С<sup>14</sup>-глицина, после чего убивались и обрабатывались как и в первой серии опытов с применением тех же методов исследования.

## Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего мы поставили перед собой цель — установить на интактных крысах срок экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином, при котором происходит максимальное включение его метки в углеводы головного мозга.

Известно, что различные регуляторные приспособления в организме поддерживают в тканях динамическое постоянство состава и потому по изменению количества вещества трудно судить о его метаболической активности. В этом отношении более надежные результаты дает метод изотопной индикации.

Так, в наших опытах было показано, что на протяжении 4 часов экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином содержание глюкозы и гликогена в мозгу крыс, как и следовало ожидать, сохраняется на одинаковом уровне. В то же время интенсивность обмена этих веществ существенно и по-разному изменяется через 1, 2 и 4 часа после введения аминокислоты (рис. 1).

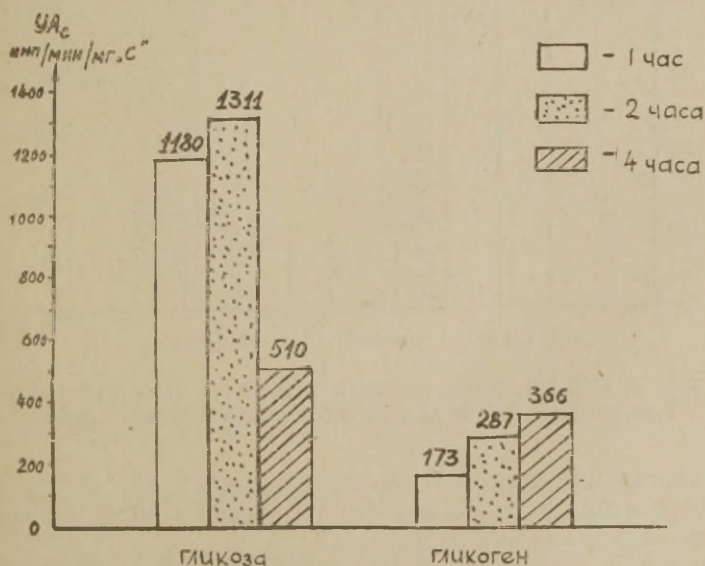


Рис. 1. Удельная активность (У.Ас) глюкозы и гликогена мозга в разные сроки экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином.

Согласно представленным данным, на протяжении первых двух часов экспозиции с меченым глицином активность глюкозы мозга находится на высоком уровне, причем через 2 часа на 11% выше, чем через 1 час. По истечении 4 часов У.А.с глюкозы резко снижается, достигая лишь 39% от величин, характеризующих радиоактивность этого вещества при двухчасовой экспозиции.

В то же самое время У.А.с гликогена через 2 часа после введения 1-С<sup>14</sup>-глицина оказывается повышенной до 166% и через 4 часа — до 212% от величин, свойственных 1-часовому интервалу.

Следовательно, изотопная метка глицина в течение первых двух часов после его введения интенсивно включается в глюкозу, а в более поздние сроки (через 4 часа) активность этого моносахарида резко снижается. В то же самое время У.А.с гликогена через 1 час находится на низком уровне, возрастает через 2 часа и в еще большей степени через 4 часа после инъекции изотопа.

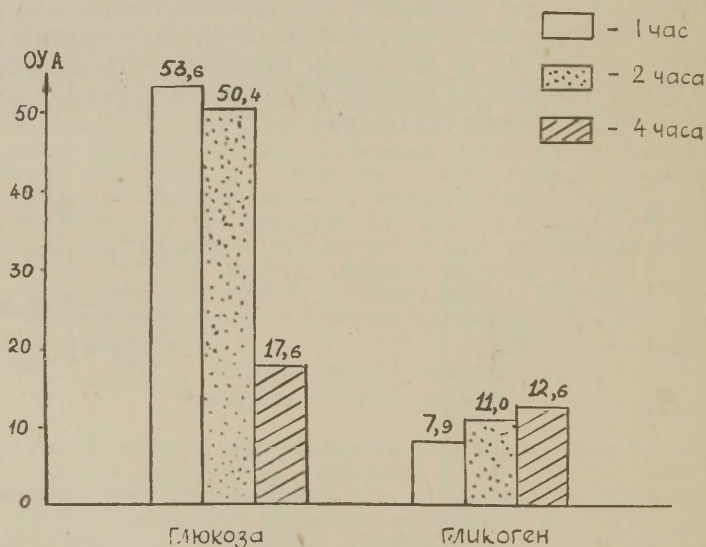


Рис. 2. Относительная удельная активность (О.У.А.) глюкозы и гликогена мозга в разные сроки после введения глицина.

Аналогичный характер носят изменения О.У.А. глюкозы и гликогена мозга в те же интервалы времени после введения источника радиоактивности (рис. 2).

Так, если общая радиоактивность гомогената повышается через 2 часа на 15% и через 4 часа на 29,3% по сравнению с 1-часовой экспозицией с глицином, то О.У.А. глюкозы, т. е. доля



ее активности в общей радиоактивности мозговой ткани сохраняется на высоком уровне в течение первых 2 часов и в 3 раза снижается спустя 4 часа после введения в организм меченой аминокислоты.

В то же самое время доля активности гликогена в общей радиоактивности гомогената возрастает через 2 часа на 39% и через 4 часа на 59% по сравнению с 1-часовым интервалом.

Таким образом, изменение У.А. глюкозы и гликогена и ее доли в общей радиоактивности гомогената носит общий характер и свидетельствует о том, что в более ранние сроки после введения 1-С<sup>14</sup>-глицина его метка оказывается в большей степени включенной в глюкозу мозга, а по мере израсходования радиоактивной глюкозы на синтез гликогена метка повышается в полисахариде и соответственно снижается в моносахариде.

Еще более убедительным становится такое заключение при сопоставлении величин радиоактивности глюкозы и гликогена мозга в каждый из испытанных сроков экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином (рис. 3).

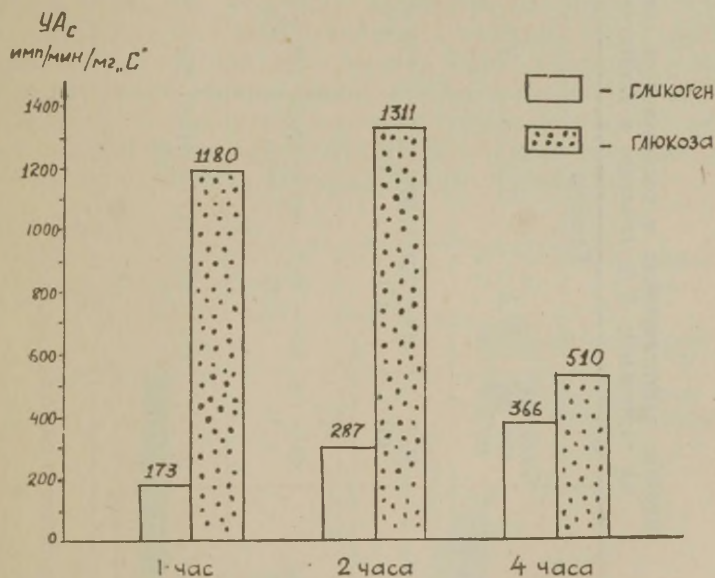


Рис. 3. Сравнение интенсивности обмена глюкозы и гликогена в разные сроки экспозиции с 1-С<sup>14</sup>-глицином.

Анализ полученных результатов показывает, что через 1 час после поступления в организм источника радиоактивности в головном мозгу У.А. глюкозы почти в 7 раз выше, чем У.А. гликогена, через 2 часа эта величина снижается до 4,5, а спустя

Таблица 1

Влияние адреналэктомии и последующего введения гидрокортизона  
на содержание У.А. глюкозы и гликогена головного мозга

Крысы	Глюкоза				Гликоген			
	Содержа- ние в мг%	У.А.	У.А <sub>c</sub>	У.А <sub>1</sub>	Содержа- ние в мг%	У.А.	У.А <sub>c</sub>	У.А <sub>1</sub>
Ложнооперированные	$51 \pm 1,7$ (9)*	$459 \pm 5,3$ (7)	$1146 \pm 27,2$ (7)	$223 \pm 5,5$ (7)	$70,6 \pm 5,0$ (8)	$211 \pm 20,6$ (8)	$474 \pm 46,6$ (8)	$138 \pm 14,7$ (8)
Адреналэктомированные	$48 \pm 1,8$ (13)	$348 \pm 47,7$ (13)	$867 \pm 120,2$ (13)	$148 \pm 15,9$ (13)	$69,8 \pm 4,0$ (11)	$219 \pm 21,4$ (16)	$493 \pm 47,4$ (16)	$143 \pm 21,9$ (16)
Адреналэктомированные с введением гидрокортизона	$54 \pm 1,3$ (13)	$471 \pm 44,3$ (13)	$1177 \pm 111,9$ (13)	$252 \pm 25,1$ (13)	$59,0 \pm 4,7$ (10)	$239 \pm 27,8$ (16)	$537 \pm 62,5$ (16)	$159 \pm 21,3$ (16)

\* В скобках количество опытов.

4 часа после введения глицина, У.А.<sub>с</sub> глюкозы превосходит соответствующую активность гликогена лишь в 1,4 раза, а величины У.А.<sub>г</sub> (пересчет на вещество, содержащееся в 1 г ткани) в это время становятся одинаковыми для глюкозы и гликогена мозга.

Следовательно, и в этом случае получаются веские доказательства того, что в начале активность глюкозы мозга значительно выше, чем гликогена, а в более поздние сроки экспозиции с I-C<sup>14</sup>-глицином радиоактивность глюкозы снижается, а гликогена соответственно повышается.

В дальнейшем мы задались целью проследить влияние адrenaлэктомии и последующего введения гидрокортизона на интенсивность обмена глюкозы и гликогена мозга через 4 часа после введения радиоактивного глицина. Такой срок экспозиции с I-C<sup>14</sup>-глицином был нами избран в связи с тем, что, как показали результаты первой серии опытов, четырехчасовая экспозиция с радиоактивным глицином явилась наиболее эффективной в отношении интенсивности включения его метки в гликоген мозга. Для сравнения параллельно с мозгом исследовалась также печень в тех же условиях эксперимента. Результаты этой серии опытов на мозге представлены в таблице 1 и на рисунке 4.

Удаление надпочечников и последующее введение кортизола почти не изменяют содержания глюкозы и гликогена мозга. Радиоактивность гомогенатов мозговой ткани незначительно возрастает под влиянием адrenaлэктомии и в еще большей степени через 4 часа после дачи гормона таким животным.

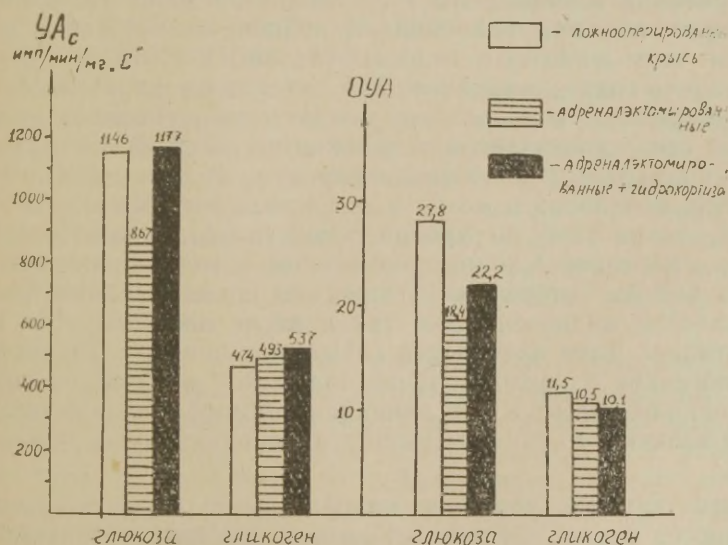


Рис. 4. Влияние адrenaлэктомии и последующего введения гидрокортизона на У.А.<sub>с</sub> и О.У.А. глюкозы и гликогена мозга.



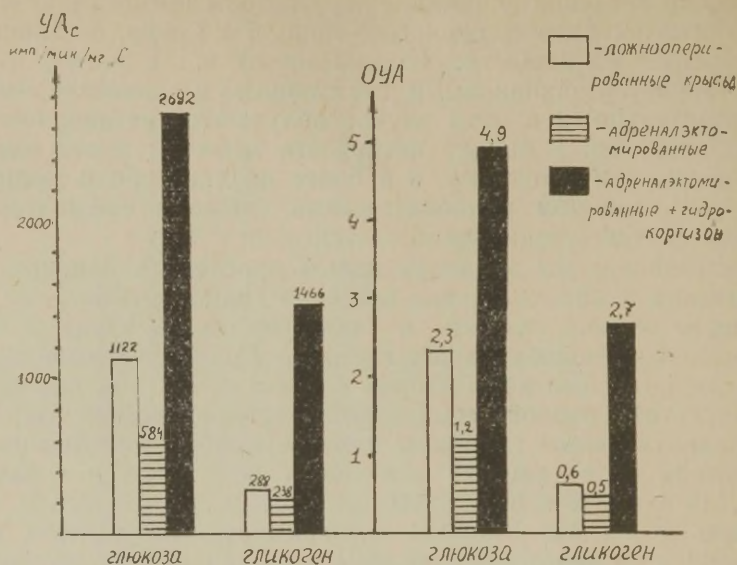


Рис. 5. Влияние адреналэктомии и введения гидрокортизона на У.А.с и О.У.А. глюкозы и гликогена печени.

Из рисунка 4 видно, что У.А.с гликогена мало изменяется в мозгу крыс как при удалении их надпочечников, так и после введения этим животным гидрокортизона. И в том, и в другом случае происходит повышение У.А.с гликогена на 14 и 13% от соответствующих контрольных показателей. Радиоактивность глюкозы при адреналэктомии снижается на 24% от величин, полученных для мозга ложнооперированных крыс, а под влиянием гидрокортизона в мозгу у оперированных животных У.А.с глюкозы возрастает до уровня, свойственного ложнооперированному животному. Сходные изменения в мозгу отмечены для величин О.У.А., которые для гликогена почти не меняются как при удалении надпочечников, так и после введения этим крысам гормона. Доля активности глюкозы в общей радиоактивности гомогената в первом случае снижается на 34% от ложнооперированных крыс, а под влиянием гормона увеличивается на 18% от величин, характеризующих адреналэктомированных животных.

Таким образом, удаление надпочечников мало сказывается на процессе использования глицина в биосинтезе гликогена и незначительно снижает этот процесс в отношении глюкозы мозга.

Гидрокортизон, введенный крысам, лишенным надпочечни-

ков, почти не изменяет радиоактивность гликогена и незначительно усиливает включение метки от аминокислоты в глюкозу.

Судя по нашим данным, мозг проявляет известную устойчивость по отношению к таким воздействиям, как удаление надпочечников и введение гидрокортизона. Это согласуется с наблюдениями других авторов, показавших отсутствие влияния кортикостероидов на углеводный обмен головного мозга (28, 29).

Параллельные исследования на печени выявили иную реакцию органа на удаление надпочечников и введение гидрокортизона.

У адrenaлэктомированных крыс в печени снижается содержание глюкозы и гликогена соответственно на 37% и 48% от контроля (ложнооперированных животных).

После дачи гидрокортизона в печени этих животных возрастает количество глюкозы на 21% и гликогена на 76%. Следовательно, гидрокортизон стимулирует накопление глюкозы и гликогена в печени. Представленные на рис. 5 данные свидетельствуют о степени участия 1-С<sup>14</sup>-глицина в этом процессе.

В печени адrenaлэктомированных крыс снижается У.А.<sub>c</sub> глюкозы и гликогена, а после введения таким животным гидрокортизона в печени резко возрастает радиоактивность углеводов: глюкозы в 4,6 раза и гликогена в 6 раз.

Эта тенденция сдвигов оказывается ещё более выраженной в отношении У.А.<sub>1</sub> (рассчитанной на углерод вещества, содержащегося в 1 г печеночной ткани). В этом случае под влиянием кортизола увеличивается У.А. глюкозы в 3 раза и гликогена в 7 раз, если сравнить с печенью адrenaлэктомированных животных без воздействия гормона.

С целью проследить долю активностей глюкозы и гликогена в общей радиоактивности печеночной ткани нами определялась радиоактивность гомогената печени и вычислялась О.У.А. исследуемых веществ. Как видно из рисунка 5, величины О.У.А. глюкозы и гликогена печени крыс снижаются при удалении их надпочечников и значительно повышаются после введения этим животным гидрокортизона, а именно: доля активности вещества в общей радиоактивности гомогената печени возрастает для глюкозы в 4,0, а для гликогена — в 5,6 раза.

Таким образом, полученные нами данные убедительно показывают, что в печени адrenaлэктомированных крыс снижаются как содержание глюкозы и гликогена, так и их удельные активности. В еще большей степени уменьшается О.У.А. углеводов печени крыс при удалении их надпочечников. После инъекции кортизола в печени у таких животных несколько увеличивается количество глюкозы и гликогена и особенно резко возрастают величины У.А., а также доля их активности в общей радиоактивности гомогената печеночной ткани.

Результаты представленных экспериментов позволяют сде-

лать заключение, что в печени белых крыс, лишенных надпочечников, тормозится участие глицина в биосинтезе углеводов, а под влиянием активного глюкотропного гормона коры надпочечников, каким является гидрокортизон, значительно стимулируется процесс превращения глицина в глюкозу и гликоген печени белых крыс.

Сравнивая эти показатели с теми, которые выявлены при исследовании мозга, можно сделать вывод о своеобразии ответной реакции этих двух органов на воздействие глюкотропных гормонов коры надпочечников.

### Выводы

1. Глицин участвует в биосинтезе углеводов мозга, причем в более ранние сроки экспозиций (через 1 и 2 часа) У.А. глюкозы значительно превышает активность гликогена, а через 4 часа, в связи с израсходованием части меченой глюкозы на синтез гликогена, радиоактивность моносахарида снижается, а полисахарида соответственно возрастает.

2. Как удаление надпочечников, так и последующее 4-часовое воздействие гидрокортизона мало изменяют содержание и У.А. гликогена мозга. Интенсивность обмена глюкозы лишь незначительно снижается при адреналэктомии и возрастает под влиянием гидрокортизона.

3. В печени при удалении надпочечников несколько тормозится превращение 1-С<sup>14</sup>-глицина в глюкозу и гликоген, а через 4 часа после введения гидрокортизона, в том же органе возрастает количество глюкозы (на 21%) и гликогена (на 76%), а также значительно увеличивается У.А. (глюкозы в 3 раза и гликогена в 6—7 раз) по сравнению с величинами, свойственными печени оперированных животных, не получавших гормона.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Gavosto F., Pileri A., Bruesca A., *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 2, 250, 1957.
2. Rosen F., Nichol C. A., *Vitamins and Hormones*, **21**, 135, 1963.
3. Harding H. R., Rosen F., Nichol C. A., *Amer. J. Physiol.*, **201**, 2, 271, 1961.
4. Rosen F., Roberts N. R., Budnick L. E., Nichol C. A., *Science*, **127**, 3293, 287, 1958.
5. Lacroix E., Leusen I., *Exptl. Med. and Surg.*, **17**, 2—3, 170, 1959.
6. Rosen F., Roberts N. R., Budnick L. E., Nichol C. A., *Endocrinology*, **65**, 2, 256, 1959.
7. Rosen F., Roberts N. R., Nichol C. A., *J. Biol. Chem.*, **234**, 3, 476, 1959.
8. Gordon H. N., Peer L. A., Bernhard W. G., *Biol. neonatorum*, **3**, 1, 18, 1961.
9. Jamamoto T., *Folia Pharmacol. Japon*, **56**, 5, 1116, 1960.



10. Hess W. C., Shaffran J. P., Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 83, 1, 804, 1953.
11. Шабанов Н. О., Укр. биохим. ж., 34, 3, 338, 1962.
12. Hilz H., Tarnowski N., Arend P.; Biochem. and Biophys. Res. Commun., 10, 6, 492, 1963.
13. Britton S. W., Silvette H., Amer. J. Physiol., 100, 3, 693, 1932.
14. Hübener H. J., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 322, 3—6, 135, 1960.
15. Long C., Endocrinology, 30(6), 870, 1942.
16. Russel J. A., Amer. J. Physiol., 121, 755, 1938.
17. Frutean de Laclos C., Hedon L., Khau van Kien L., Macabies J., Turchini J., Compt. rend. Soc. Biol., 149, 78, 782, 1955.
18. Glenn E. M., Bowman B. J., Bayer R. B., Meyer C. O., Endocrinology, 68, 3, 386, 1961.
19. Ringler I., Bortle L., Heyder E., Monteforte A., Perrine J., Ross E., Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 102, 3, 626, 1959.
20. Derache R., Tremolieres J., Griffaton G., Lowy R., Ann. Endocrinol., 17, 746, 1956.
21. Britton S. W., Silvette H., Amer. J. Physiol., 100, 3, 701, 1932.
22. Lockett M. F., Evans M. M., J. Endocrinol., 7, 4, 357, 1951.
23. Pina Garza Enrique, Rev. Fac. med. Univ. nac. autonomna Mexico, 3, 3, 533, 1961.
24. Petersen V. P., Lotspeich W. D., Amer. J. Physiol., 182, 2, 273, 1955.
25. Chance M. R. A., Walker A. P., J. Endocrinol., 10, 4, 316, 1954.
26. Potop J., Felix E., Ciocirdia C., Comun. Acad. RPR, 7, 7, 679, 1957.
27. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Методы определения радиоактивного углерода, изд-во Лен. ун-та, 43, 1959.
28. Валуева Т. К., Маевская И. П., Укр. физиол. ж., 2, 3, 164, 1956.
29. Маєвська І. П., Фізіол. ж., 3, 1, 98, 1957.

## СИСТЕМА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ- АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗА И ТРАНСПОРТ ГЛЮКОЗЫ В МОЗГОВУЮ ТКАНЬ

А. С. Оганесян, А. А. Демирчян

Институт биохимии АН Арм. ССР, Ереван

Исследованиями ряда авторов (1—4) установлено, что в мышечной, почечной, жировой и некоторых других тканях трансмембранный перенос глюкозы имеет природу активного транспорта и регулируется инсулином. Что касается мозговой ткани, то установлено, что инсулин не переходит через гемато-энцефалический барьер и не оказывает непосредственного влияния на транспорт глюкозы в мозговую ткань. Результаты наших исследований также показали, что инсулин не оказывает влияния на поглощение глюкозы мозговой тканью. По некоторым литературным данным, трансмембранный перенос глюкозы в мозговой ткани не является простой диффузией.

В течение ряда лет мы изучаем биохимические механизмы трансмембранного переноса глюкозы, ионов калия и натрия, а также неорганических фосфатов в почечной и мышечной тканях. Было установлено, что в этих тканях система АТФ-АТФаза принимает активное участие в трансмембранном переносе глюкозы. Эти данные дали нам основание провести ряд исследований по выяснению роли системы АТФ-АТФазы в процессах транспорта глюкозы также в мозговую ткань.

Опыты были поставлены со срезами коры больших полушарий головного мозга. Инкубация проводилась на фосфатном буфере pH 7,4 при 37°С в течение одного часа. Глюкоза определялась по методу Дюмазера, ее содержание в инкубируемой среде составляло 100 мг%. В инкубируемой среде АТФ определялся по приросту неорганического фосфата после 10-минутного гидролиза в 1 н растворе соляной кислоты. Активность АТФазы определялась по методу Бонтинга и сотр. (5), гликолиз изучался по количеству образовавшейся молочной кислоты, которая определялась по методу Баркер-Саммерсона (6) в анаэробных условиях.

Результаты исследований приводятся на соответствующих рисунках.

Как видно из рис. 1, АТФ и АДФ стимулируют поглощение глюкозы мозговой тканью, а АМФ не оказывает влияния на этот процесс.

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что АТФ в концентрации от 3 до 24 мМ способствует поглощению глюкозы; дальнейшее увеличение его содержания в инкубируемой среде приводит к постепенному понижению поглощения глюкозы.

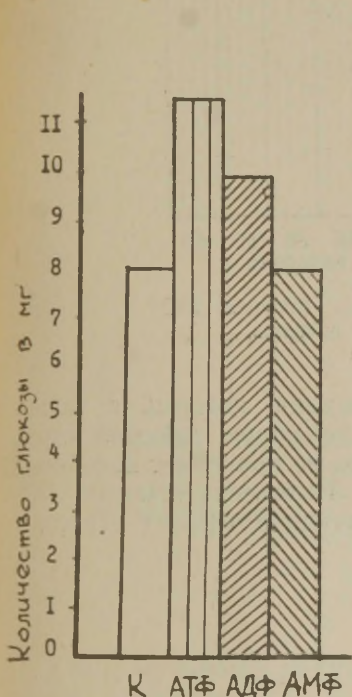


Рис. 1. Влияние АТФ, АДФ и АМФ на поглощение глюкозы мозговой тканью.

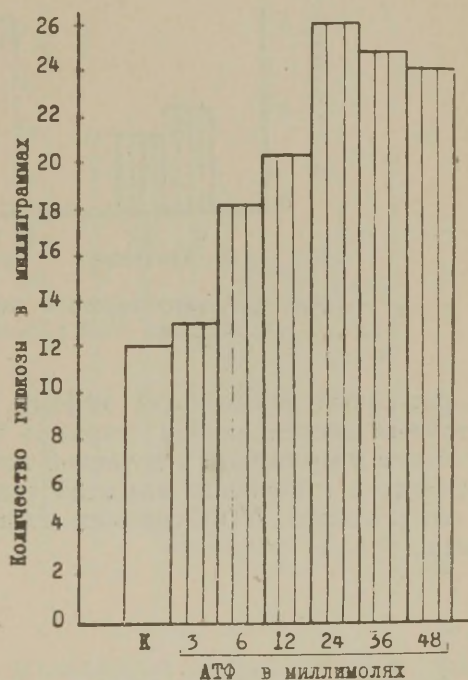


Рис. 2. Влияние различных концентраций АТФ на поглощение глюкозы мозговой тканью.

Подобный эффект АТФ оказывает и *in vivo*. При введении АТФ в сонную артерию наблюдается значительное повышение артерио-венозной разницы по глюкозе, т. е. усиливается поглощение глюкозы мозгом (рис. 3).

На рис. 4 приведены результаты опытов по влиянию инсулина и строфантина (который подавляет активность АТФазы) на поглощение глюкозы мозговой тканью. Как видно, инсулин не стимулирует поглощение глюкозы, а строфантин оказывает



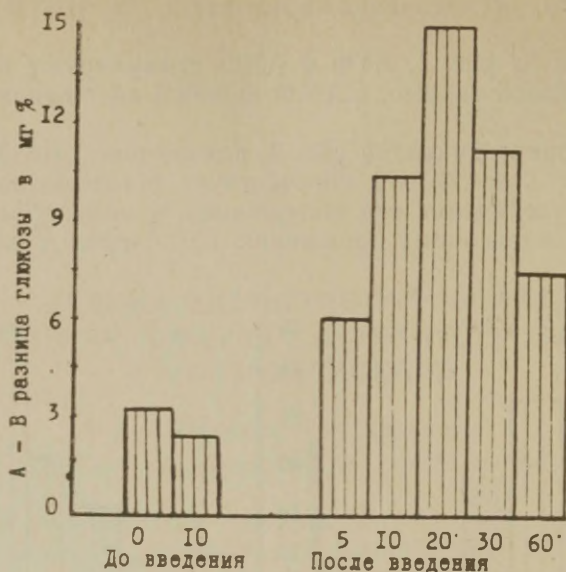


Рис. 3. Артерио-венозная разность глюкозы при введении АТФ в сонную артерию.

выраженный тормозящий эффект. Инсулин, который в наших прежних исследованиях устранял подавляющее действие строфантина в мышечной и почечной тканях, не проявляет подобного эффекта в отношении мозговой ткани. Интересно отметить, что в этих опытах АТФ снимает ингибирующий эффект строфантина.

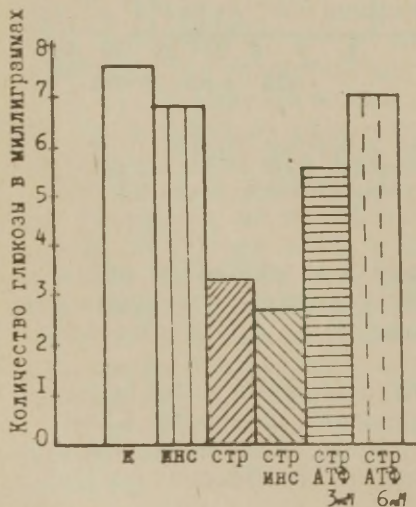
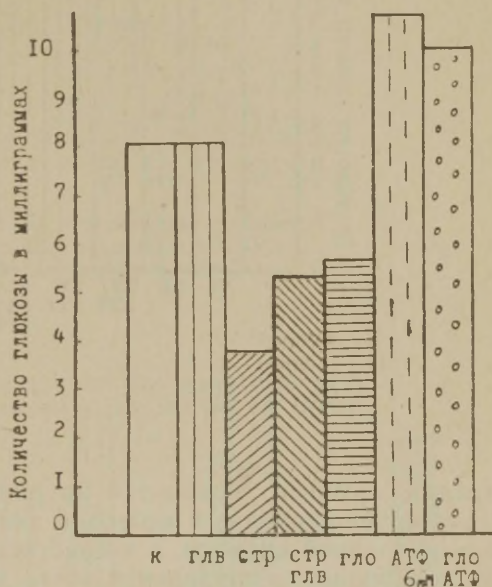


Рис. 4. Влияние инсулина, строфантина и АТФ на поглощение глюкозы мозговой тканью.

Мы предполагали, что стимулирующий эффект АТФ в отношении поглощения глюкозы мозговой тканью, по-видимому, связан с его взаимодействием с АТФазой, и учитывая, что этот фермент является тиоловым ферментом, мы проверили влияние некоторых тиоловых реагентов (парахлормеркурибензойная кислота — п-ХМБ, и N-этилимид малеиновой кислоты — НЭМ), а также глутатиона (восстановленного и окисленного) на поглощение глюкозы мозговой тканью.

Рис. 5. Влияние глутатиона (восстановленного и окисленного) на поглощение глюкозы мозговой тканью.



Как показывают данные, приведенные на рис. 5, восстановленный глутатион, сам по себе не оказывая влияния на поглощение глюкозы, частично снимает тормозящее действие строфантина, а окисленный глутатион проявляет подавляющий эффект, что устраняется АТФ.

Рис. 6 показывает, что тиоловые реагенты — п-ХМБ и НЭМ подавляют поглощение глюкозы, а АТФ и восстановленный глутатион снимают этот эффект тиоловых реагентов, при этом эффект глутатиона проявляется в более выраженной форме, чем эффект АТФ. Интересно отметить, что даже в присутствии тиоловых реагентов добавление восстановленного глутатиона приводит к значительному усилению стимулирующего действия АТФ в отношении поглощения глюкозы.

В дальнейшем нас интересовал вопрос влияния АТФ на гликолиз — образование молочной кислоты. Результаты этих иссле-

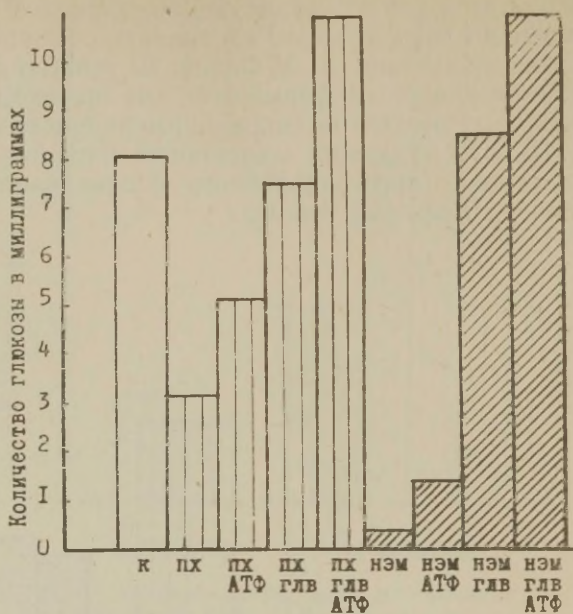


Рис. 6. Влияние тиоловых реагентов (ПХМБ и НЭМ) на поглощение глюкозы мозговой тканью.

дований, которые приводятся на рис. 7, показывают, что АТФ стимулирует гликолиз в мозговой ткани, т. е. усиливает образование молочной кислоты, а в присутствии п-ХМБ и НЭМ, наоборот, наблюдается подавление этого процесса. Восстановленный глутатион и АТФ снимают тормозящий эффект тиоловых реагентов на гликолиз. Восстановленный глутатион слегка усиливает гликолиз.

Имея в виду, что в мышечной и почечной тканях, вместе с АТФ, АТФаза также принимает участие в процессах трансмембранного переноса глюкозы, мы провели ряд исследований по изучению роли этого фермента в процессах мембранной проницаемости в мозговой ткани. Было установлено (рис. 8), что агенты, подавляющие поглощение глюкозы (строфантин, п-ХМБ и НЭМ), ингибируют также активность АТФазы, с другой стороны, восстановленный глутатион и АТФ снимают ингибирующий эффект этих препаратов. Вместе с тем АТФ и АДФ значительно повышают активность АТФазы. Этот эффект АТФ в более выраженной форме проявляется в присутствии восстановленного глутатиона. Данные, приведенные на рис. 8, также показывают, что как строфантин, так и п-ХМБ и НЭМ подавляют эффект АТФ на активность АТФазы. Однако при добавлении восстановленного глутатиона, несмотря на присутствие в инку-



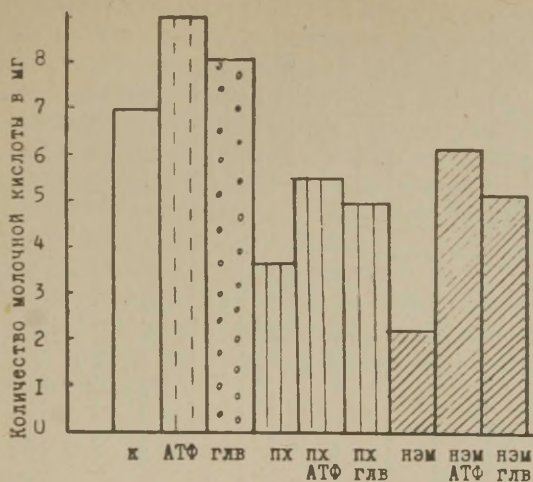


Рис. 7. Влияние АТФ, глутатиона (восстановленного) и тиоловых реагентов (ПХМБ и НЭМ) на гликолиз.

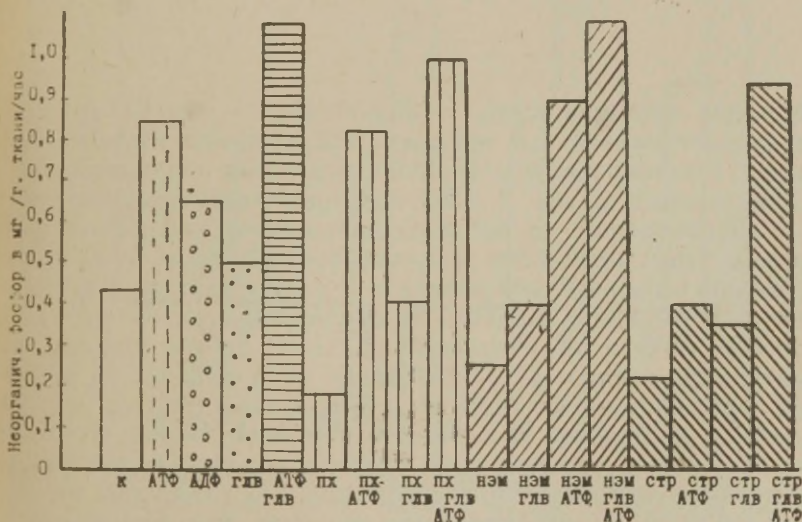


Рис. 8. Влияние АТФ, АДФ, глутатиона (восстановленного), ПХМБ, НЭМ и строфантина на активность АТФазы мозговой ткани.

бируемой среде упомянутых ингибиторов, влияние АТФ на активность АТФазы проявляется в более выраженной форме.

Можно было подумать, что стимулирующий эффект АТФ в отношении поглощения глюкозы не связан с его действием на

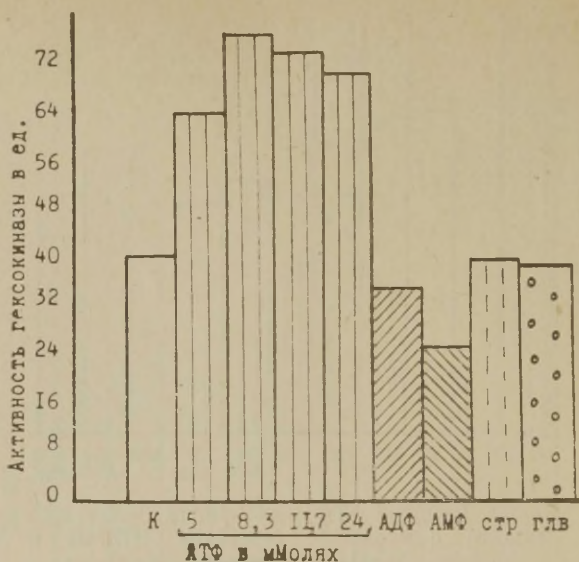


Рис. 9. Влияние АТФ, АДФ, АМФ и строфантина на активность гексокиназы мозговой ткани.

мембранную проницаемость, а является результатом его действия на внутриклеточные процессы превращения глюкозы, как например, гексокиназную реакцию. Однако как показывают данные, приведенные на рис. 9, АТФ повышает гексокиназную реакцию в концентрации до 8,3 мМ, дальнейшее увеличение концентрации этого препарата в инкубируемой среде приводит к торможению гексокиназной реакции. А между тем, как уже было показано, поглощение глюкозы стимулируется даже при наличии 24 мМ АТФ в инкубируемой среде. С другой стороны, по литературным данным (7), АТФ почти не проникает во внутрь клетки через клеточную оболочку, что подтверждается и нашими некоторыми наблюдениями. Из рис. 9 также видно, что АДФ слегка, а АМФ в значительной степени подавляют активность гексокиназы. Строфантин и восстановленный глутатион не оказывают влияния на гексокиназную реакцию. Эти данные свидетельствуют о том, что стимулирующее действие АТФ в отношении поглощения глюкозы связано с его воздействием на мембранную АТФазу, что в результате приводит к повышению проницаемости клеточной оболочки в отношении глюкозы.

Приведенные данные дали нам основание полагать, что стимулирующий эффект АТФ на транспорт глюкозы в мозговую ткань, связан с расщеплением АТФ. Строфантин и тиоловые

реагенты, подавляя активность АТФазы, предотвращают расщепление АТФ и тем самым подавляют транспорт глюкозы.

Применяемые нами ингибиторы п-ХМБ и НЭМ, а также восстановленный глутатион могут оказывать влияние на активность внутриклеточных ферментов, принимающих участие в процессах гликолиза, особенно на 3-фосфоглицеринальдегиддегидрогеназу, в активную группу которой входит глутатион.

В связи с этим в следующей серии опытов активность АТФазы срезов мозговой ткани регулировали путем добавления или изъятия различных ионов (натрия, калия и магния), являющихся активаторами этого фермента (5, 7, 8—10). Опыты проводились со срезами коры больших полушарий головного мозга на трисбуфере рН 7,4 при 37°C в присутствии или отсутствии ионов калия, натрия и магния.

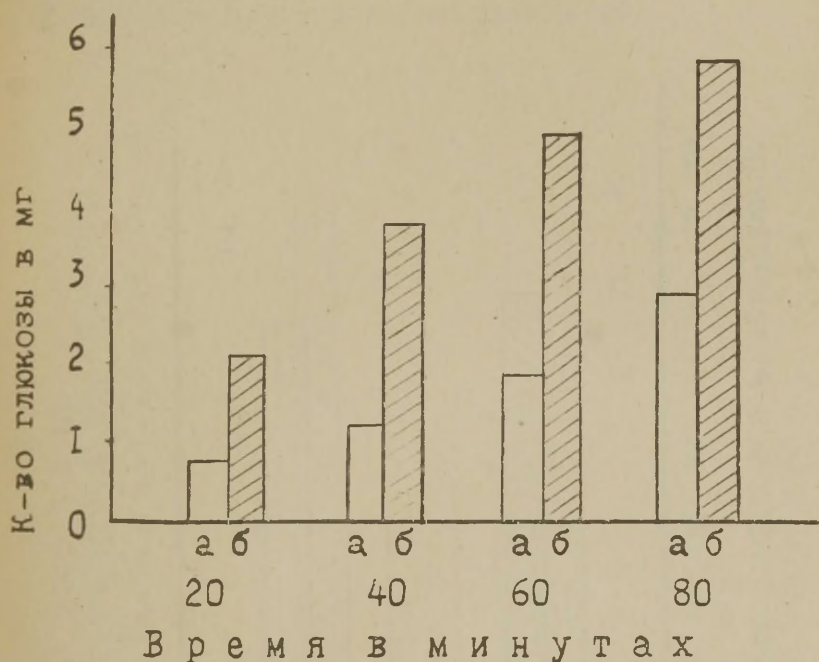


Рис. 10. Поглощение глюкозы срезами мозговой ткани в отсутствии (а) и присутствии (б) ионов калия, натрия и магния в различное время от начала опыта.

Как видно из данных, приведенных на рис. 10, в отсутствии ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$  количество глюкозы, поглощенной мозговой тканью, значительно меньше, чем в присутствии этих ионов. Параллельно проведенные опыты по определению активности АТФазы показывают, что в отсутствии ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$



Рис. 11. Активность АТФазы срезов мозговой ткани в отсутствии (а) и при-  
сутствии (б) ионов калия, натрия и маг-  
ния.

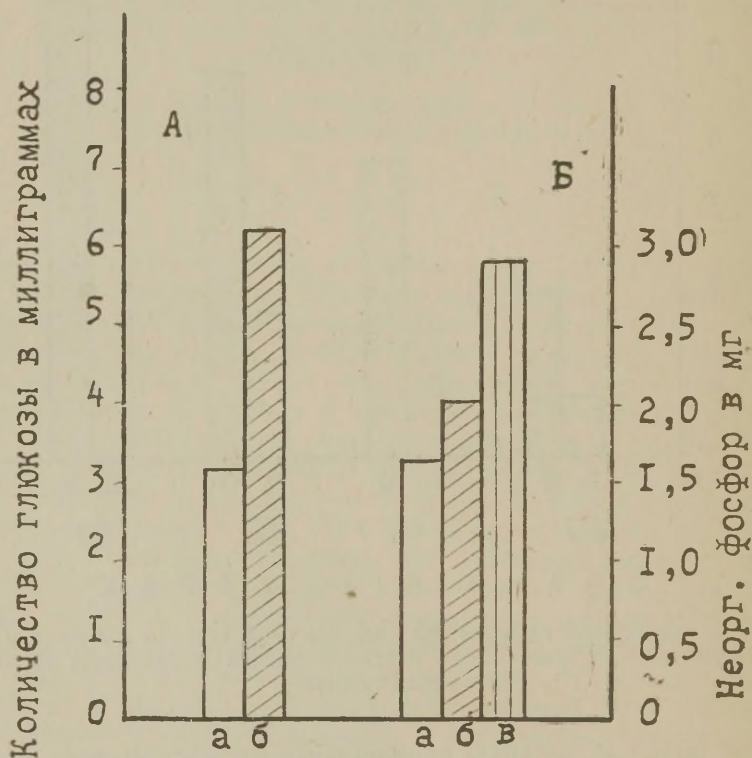
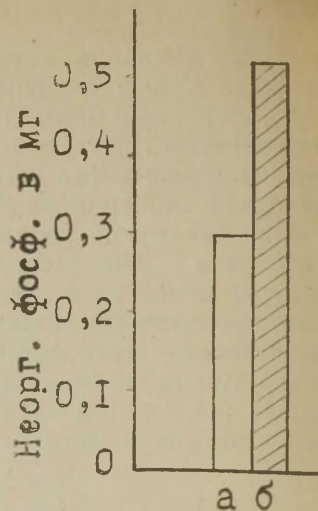


Рис. 12А. Поглощение глюкозы (А) и расщепление АТФ (Б) в  
отсутствии ионов калия, натрия и магния. а — на 20 мин; б —  
на 40 мин; в — количество неорганического фосфата, отщеплен-  
ного от добавленного АТФ после 10-минутного гидролиза.

активность АТФазы значительно ниже, чем в присутствии этих ионов (рис. 11).

Рис. 12А и 12Б показывают, что в присутствии ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$  расщепление АТФ срезами мозговой ткани происходит значительно быстрее, чем в отсутствии этих ионов. В соответствии с этим наблюдается ускорение транспорта глюкозы при усиленном расщеплении АТФ и наоборот. В присутствии ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$  добавленный в инкубируемую среду АТФ расщепляется в течение первых 40 минут, а в отсутствии этих ионов этот процесс протекает медленно и продолжается в течение 80 минут (рис. 13). Интересно отметить, что почти весь неорганический фосфат, отщепленный из добавленного АТФ, находится в инкубируемой среде. Это подтверждает, что АТФ не проникает через клеточную мембрану и на поверхности клеточной оболочки расщепляется на АДФ и неорганический фосфат.

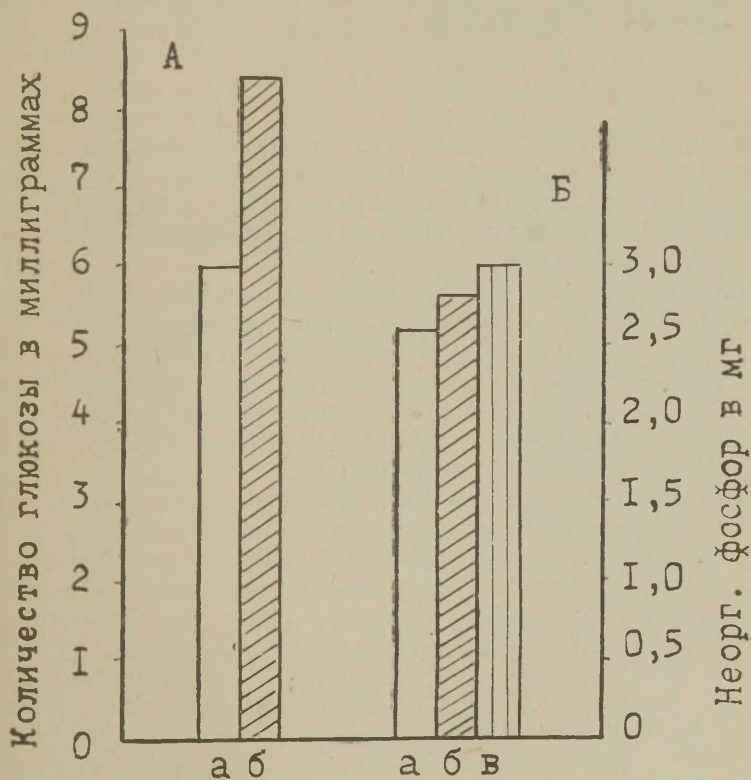


Рис 12Б. Поглощение глюкозы (А) и расщепление АТФ (Б) в присутствии ионов калия, натрия и магния. Остальные обозначения те же, что и на рис. 12А.

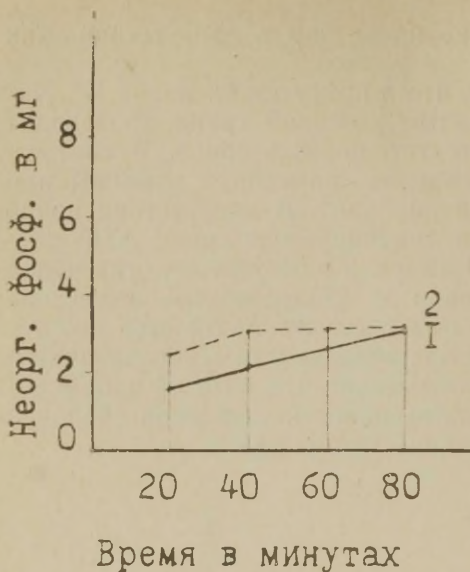


Рис. 13. Расщепление АТФ в различное время от начала опыта в отсутствии (1) и присутствии (2) ионов калия, натрия и магния.

Эти данные показывают, что процесс транспорта глюкозы в мозговой ткани тесно связан с расщеплением АТФ. Подавление этого процесса приводит к торможению поглощения глюкозы и, наоборот, ускорение его приводит к усилению транспорта глюкозы в мозговую ткань.

Приведенные данные показывают, что АТФ и АДФ ускоряют транспорт глюкозы в мозговую ткань. Стимулирующий эффект АТФ тесно связан с его расщеплением АТФазой. Подавление активности АТФазы приводит к замедлению расщепления АТФ и торможению поглощения глюкозы и, наоборот, повышение активности этого фермента вызывает усиление расщепления АТФ и ускорение поглощения глюкозы.

Надо полагать, что тиоловые реагенты блокируют сульфгидрильные группы АТФазы, которые как по литературным, так и по нашим данным имеют важное значение в проявлении ее ферментативной активности. Восстановленный глутатион снимает ингибирующее действие тиоловых реагентов на активность АТФазы путем восстановления ее сульфгидрильных групп. В результате восстанавливается нормальная картина поглощения глюкозы. Тиоловые реагенты также подавляют стимулирующий эффект АТФ в отношении транспорта глюкозы, что является результатом блокирования SH-групп АТФазы, которые, по литературным данным, имеют важное значение в процессе взаимодействия АТФ с АТФазой. Восстановленный глутатион вытесняет тиоловые реагенты, связанные с миозином, и восстанавли-



вает SH-группы этого белка; на этом фоне эффект добавленного АТФ проявляется в более выраженной форме.

Таким образом, наши данные также показывают, что SH-группы АТФазы являются активными центрами этого фермента, имеют важное значение в процессе связывания АТФ с АТФазой, следовательно, и в процессе транспорта глюкозы.

В присутствии АТФ наблюдается некоторое устранение подавляющего эффекта строфантина и тиоловых реагентов в отношении поглощения глюкозы и активности АТФазы, что объясняется его защитным действием на сульфгидрильные группы АТФазы. Надо полагать, что ингибирующий эффект строфантина также связан с его блокирующим действием на сульфгидрильные группы АТФазы, т. к. восстановленный глутатион снимает этот эффект. Не исключена возможность, что стимулирующее действие АДФ в отношении транспорта глюкозы, который по своему эффекту несколько уступает АТФ, связан с его предварительным превращением в АТФ.

Наблюдаемые изменения в процессе гликолиза под действием АТФ и тиоловых реагентов мы склонны объяснить их первичным действием на мембранную проницаемость. Усиление или торможение транспорта глюкозы может привести к соответствующим изменениям в процессе гликолиза. Тормозящее действие окисленного глутатиона связано с его влиянием на активность мембранной АТФазы.

Исследованиями ряда авторов установлено, что в пределах клеточных мембран различных тканей локализована АТФаза, которая активируется ионами  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$  и принимает участие в процессах транспорта ионов натрия и калия. Наши исследования показывают, что этот фермент принимает участие также в процессах трансмембранного переноса глюкозы. Изменение транспорта глюкозы в присутствии и отсутствии ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $Mg^{++}$  объясняется изменением активности мембранной АТФазы и скоростью расщепления АТФ. По нашим другим наблюдениям, в зависимости от условий окружающей среды, в результате окисления и восстановления SH-групп изменяется активность мембранной АТФазы клетки. При этом наблюдается также изменение интенсивности транспорта глюкозы. Не исключена возможность, что этим путем регулируется скорость транспорта глюкозы через клеточную мембрану в условиях *in vivo*.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что система АТФ—АТФаза принимает непосредственное участие в процессах транспорта глюкозы в мозговой ткани.

Надо полагать, что определенный компонент клеточной мембраны, имеющий в своем составе сульфгидрильное соединение (по всей вероятности АТФаза), принимает активное участие в трансмембранном переносе глюкозы и регулирует этот процесс. Сульфгидрильные группы этого соединения имеют также важ-

ное значение в механизме стимулирующего действия АТФ на транспорт глюкозы. Блокирование его SH-групп приводит к торможению активности АТФазы, поглощения глюкозы и подавлению стимулирующего действия АТФ. И наоборот, восстановление этих групп приводит к повышению активности АТФазы и усилению транспорта глюкозы.

Результаты предварительных опытов показали, что АТФ ускоряет также транспорт и обмен глутатиона в мозговой, печеночной, почечной и других тканях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Levine R., Goldstein M. S., Huddleston B., Klein S. P., *Am. J. Physiol.*, **163**, 70, 1950.
2. Park C. R., Post R. L., Kalman C. P., Wright J. H., Johnson L. H., Morgan H. E., *Ciba found. coll. on Endocrinol.*, London, **9**, 240, 1956.
3. Randle P. E., In: *Membrane transport and metabolism*, Ed. Kleinceller A. A., Kotyk E. E., Prague, 1961.
4. Бунятян Г. X., Оганесян А. С., *ДАН СССР*, **149**, 442, 1963.
5. Bonting S. L., Simon K. A., Hawkins N. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 416, 1961.
6. Barker J., Summerson W., *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941.
7. McIlwain H., *Chemical exploration of the Brain*, London, 1963.
8. Schwartz A., Bachelard H. S., McIlwain H., *Biochem. J.*, **84**, 626, 1962.
9. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 314, 1962.
10. Post R. L., Albricht C. D., In: *Membrane transport and metabolism*, Prague, 1961.

# ОБ УРЕГУЛИРОВАНИИ СОПРЯЖЕННОГО С ДЫХАНИЕМ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В НЕРВНОЙ ТКАНИ ЭКСТРАКТОМ ЭСТОНСКОЙ МОРСКОЙ ЛЕЧЕБНОЙ ГРЯЗИ

И. К. Сибуль

Институт экспериментальной биологии АН Эст. ССР, Таллин

Ранее проведенные нами исследования показали, что выделенный Эстонским институтом экспериментальной и клинической медицины АМН СССР из эстонской морской лечебной грязи богатый гуминовыми кислотами экстракт в виде препарата «Гумизоль» при парентеральном введении белым мышам угнетает АТФазу и АХЭ мозга, продлевает время переживания лягушечных спинномозговых препаратов и в известной мере стимулирует их рефлекторную деятельность, установленную способом Тюрка (2—5).

Исходя из вышеприведенных наблюдений, можно предполагать, что введенный до опыта в организм гумизоль, угнетая активность АТФазы, содействует более длительному сохранению необходимого для деятельности спинного мозга лягушек содержания АТФ и тем самым продлевает время их переживания. Однако наряду с этим предположением не исключена возможность, что естественной причиной более длительного времени переживания спинномозговых препаратов явилось участие гумизоля в процессе ресинтеза АТФ. В пользу такого предположения, по нашему мнению, говорят найденные нами в литературе единственные данные Рерабека (9) о том, что гуматы при применении у растений некоторых метаболитических ядов оказывают определенное защитное действие, активизируя процессы образования АТФ на уровне субстрата.

Для решения поставленного вопроса в настоящей работе изучалось действие гумизоля на сопряженное с дыханием фосфорилирование в гомогенатах мозга белых мышей.

## Методика

Подопытным мышам за 16 часов до начала исследования вводили подкожно 1 мл разведенного 1:100 гумизоля, а контрольным животным — такое же количество физиологического раствора хлористого натрия. После



умерщвления мышей немедленно отделяли мозг и на льду изготавливали гомогенаты, после чего со специальной инкубационной смесью по Декси и Надора (8) в аппарате Варбурга при 37°С определяли их способность к поглощению кислорода и потреблению неорганического фосфора. В качестве дыхательных субстратов смесь содержала пировиноградную и яблочную кислоты. На основе поглощения кислорода и по убыли неорганического фосфора из инкубационной смеси с расчетом на один г сырой ткани в один час по отдельным группам животных мы вычисляли показатели Р:О как степени сопряженного с дыханием фосфорилирования в гомогенатах.

## Результаты исследований

Показатели поглощения гомогенатами кислорода и потребления неорганического фосфора как у подопытных, так и у контрольных мышей, выраженные средними арифметическими, представлены на рисунке 1. Из него видно, что в опытах *in vivo* под

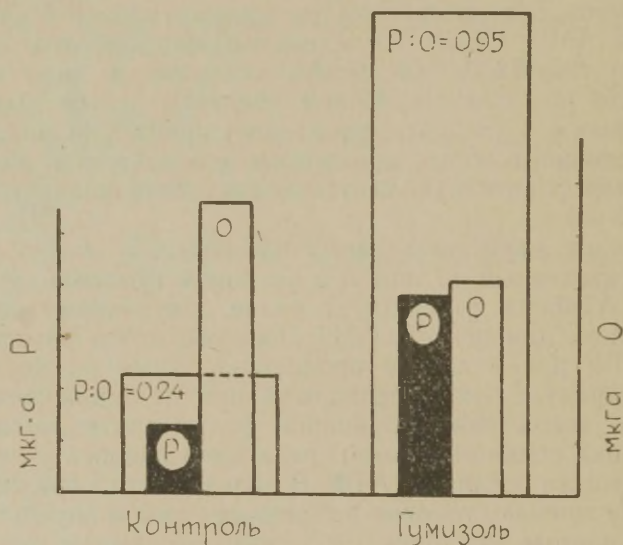


Рис. 1. Действие гумизоля *in vivo* на потребление гомогенатами мозга кислорода и фосфора.

воздействием гумизоля способность гомогенатов к поглощению кислорода несколько снижалась, но оказывалась статистически не достоверной ( $P > 0,05$ ). В то же время под воздействием экстракта грязи способность поглощения фосфора повышалась по сравнению с контролем почти в 3 раза, что статистически оказалось убедительным ( $P < 0,01$ ). В этой группе опытов Р:О как показатель степени сопряженного с дыханием фосфорилирования, повышался в основном за счет значительного по-

вышения потребления неорганического фосфора — почти в четыре раза.

Примерно такие же результаты получены нами и в опытах *in vitro*, то есть при непосредственном добавлении экстракта грязи к инкубируемым гомогенатам. Соответствующие цифровые данные приведены на рисунке 2.

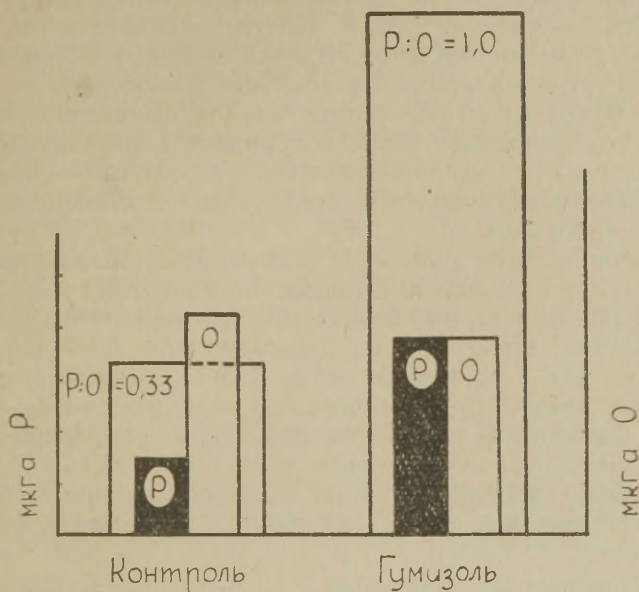


Рис. 2. Действие гумизоля *in vitro* на потребление гомогенатами мозга кислорода и фосфора.

Бросается в глаза, что понижение поглощаемости кислорода под непосредственным воздействием грязевого экстракта было несколько менее выраженным, чем в опытах *in vivo*, а потребление фосфора в то же время повышалось в три раза примерно с такой же статистической достоверностью, как и в предыдущей серии опытов. Установленное при этом увеличение коэффициента P:O было трехкратным. Примененная в инкубационной смеси концентрация препарата была  $1,6 \cdot 10^{-4}$  и меньше.

Полученные нами данные об изменениях потребления кислорода и неорганического фосфора гомогенатами мозга в связи с воздействием гумизоля *in vivo* и *in vitro* указывают на его участие в урегулировании степени сопряженности фосфорилирования и дыхания. Результаты опытов *in vivo* показали, что этому препарату свойственны «защитные» или предохраняющие от разобщения сопряженного с дыханием фосфорилирования эф-

факты. А в опытах *in vitro* добавленный к гомогенатам препарат после предшествующего разобширения вероятно восстанавливает сопряженное с дыханием фосфорилирование.

Хотя достигнутые гумизолем повышения коэффициентов Р:О гомогенатов мозга в сравнении с уровнями контроля всюду оказались весьма значительными, все же в целом они их полного восстановления не обеспечили. Это можно объяснить тем, что изготовление гомогенатов проводилось в весьма жестких условиях — без применения ЭДТА. По этой причине в гомогенатах контрольных опытов произошло почти полное разобширение окислительного фосфорилирования. Как нам кажется, такие условия опытов, с одной стороны, способствовали выявлению защитных или восстанавливающих свойств гумизола в отношении процессов окислительного фосфорилирования, и с другой — препятствовали полному восстановлению сопряжения процессов окисления и фосфорилирования.

Вышеприведенные данные о стимулирующем действии гумизола на уровень сопряжения процессов окисления и фосфорилирования пока еще не позволяют выявить конкретный механизм этого действия. Принимая во внимание, что АТФ как фактор сопряжения (7) в состоянии немедленно повысить слабую степень коэффициента Р:О гомогенатов, следует считать возможным, что достигнутое гумизолем повышение коэффициента Р:О является результатом угнетения активности АТФазы, что со своей стороны понижает скорость расщепления АТФ и тем самым обуславливает более нормальное содержание его в гомогенате.

Против такого высказывания о механизме действия гумизола говорят факты, что угнетающие АТФазу средства, как центральные ганглиоблокирующие вещества, люминал и другие, отнюдь не связывают фосфорилирование с дыханием, а наоборот, приводят к разобширению окислительного фосфорилирования (8). В связи с этим следует считать пока недоказанным, что гумизоль, угнетая АТФазу, непосредственно обеспечивает и повышение сопряженности фосфорилирования с дыханием. Конкретный ответ на этот вопрос механизма действия гумизола могут дать дальнейшие углубленные исследования.

Учитывая полученные нами в последнее время данные о том, что угнетение гумизолем активности АТФазы по своему характеру относится к ферменту типа мембранного (4, 6), мы склонны полагать, что в механизме действия этого препарата основным звеном является регулирование движения катионов через мембранную систему, активация которой вызывается влиянием его на АТФазу мембран. Активация транспортной системы мембран, очевидно, в состоянии обеспечить и повышение сопряженности фосфорилирования с дыханием путем непосредственной связи между этими двумя системами.



Приведенные данные бесспорно говорят о большой биохимической активности гумизоля, однако вопрос о действующем начале его остается все еще не выясненным и требует дальнейших исследований. По техническим условиям этот препарат представляет собой 0,01% раствор богатой гуминовыми кислотами фракции морской лечебной грязи. Кроме того, в его химический состав входят еще различные соли (35%) и органические вещества битумного характера (30%).

Из названных групп веществ высокой биологической активностью обладают гуминовые кислоты. Ряд авторов приписывает им и определенное значение в механизме терапевтического действия лечебных грязей (11). Само название препарата «Гумизоль» наводит на мысль, что именно гуминовые кислоты определяют его действие как биостимулятора (1).

Как известно, гуминовые кислоты, подобно ЭДТА, являются комплексообразователями. В связи с этим не лишне упомянуть о том, что ЭДТА лишает митохондрии имеющихся в них ионов кальция и активизирует фосфорилирующее окисление (7). В связи с этим мы склонны предполагать, что биохимическая

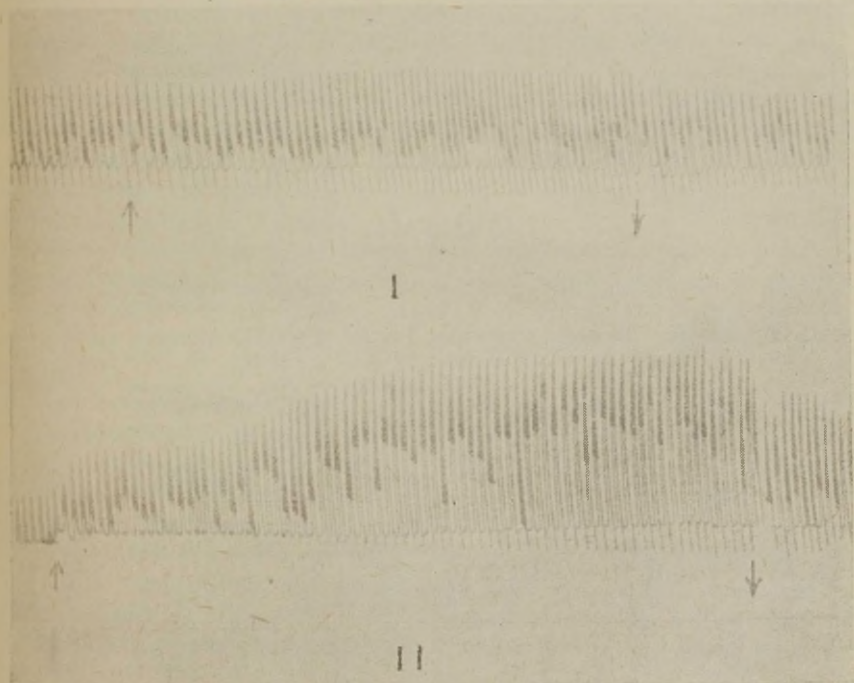


Рис. 3. Действие гумизоля (I) и ЭДТА (II) на изолированное сердце лягушки. Разведение гумизоля —  $10^{-6}$ . Концентрация ЭДТА —  $10^{-4}$ .

активность гумизоля во многом напоминает действие ЭДТА. Следует, однако, отметить, что не все комплексообразователи, как 8-оксихинолин, фенилтиомочевина и др., обеспечивают специфическое действие ЭДТА — усиление окислительного фосфорилирования (7).

Наряду со сходством биохимической активности гумизоля с защитным действием ЭДТА в отношении фосфорилирующего окисления заслуживает внимание и то, что оба эти вещества угнетают АТФазу. Между этими двумя препаратами можно было наметить и определенные различия. Например, на изолированное сердце лягушки, по Штраубу, ЭДТА оказывает выраженное положительное инотропное действие, между тем как гумизоль — положительное кронотропное действие, что все же подчеркивает и специфичность действия гумизоля.

В заключение хотелось бы сказать несколько слов по поводу общего значения проведенных нами исследований. Общеизвестно, что в Эстонии имеются морские лечебные грязи, обладающие весьма важным терапевтическим свойством. Хотя в настоящее время вполне признано стимулирующее действие грязей на животный организм, однако, в литературе отсутствуют пока данные изучения биохимического механизма их стимулирующего действия.

Надеемся, что начатые нами в этом направлении исследования на молекулярном уровне будут содействовать выяснению стимулирующих свойств лечебных грязей, а также самого явления биостимуляции, которые с научной стороны до сих пор остаются слабо выясненными.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кеель Э., Труды по курортологии I, Академия наук ЭССР, Таллин, 19, 1963.
2. Сибуль И., Тезисы докладов Республиканской научно-практической конференции терапевтов Эстонской ССР, Таллин, 41, 1959.
3. Сибуль И., Тезисы докладов совещания по материалам апробации лечебного препарата «Гумизоль», Таллин, 15, 1960.
4. Сибуль И., Труды Института экспериментальной медицины АН Литовской ССР. Ревматизм, II, Вильнюс, 277, 1961.
5. Сибуль И. К., Труды по курортологии I. АН Эстонской ССР, Таллин, 38, 1963.
6. Сибуль И., Кильдема Л., Вторая биохимическая конференция Прибалтийских республик и Белорусской ССР, Рига, 419, 1965.
7. Скулячев В. П., ДАН СССР, 1962.
8. Decsi L., Nádor K., Arzneimittelforschung, 346, 1958.
9. Řeřábek I., Symposium Humus and Plant, Prague, 245, 1962.
10. Sibul I., ENSV Teaduste Akadeemia toimetised, bioloogiline seeria № 3, 1966.
11. Беленький М. С., Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры, 5, 391, 1961.

## ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

П. Ф. Минаев, О. Ф. Логвинова

Институт биологической физики АН СССР, Москва

В настоящем исследовании приводятся данные по влиянию лучевого раздражителя на нервную систему.

Лучевой раздражитель хотя и имеет некоторые общие признаки с механическими и электрическими раздражителями, но при этом отличается рядом существенных особенностей. Так, электрический и механический раздражители вызывают у животных мгновенную бурную реакцию, проявляющуюся в общем двигательном беспокойстве, повышении кровяного давления, учащении дыхания и т. д. Лучевой раздражитель не вызывает подобной реакции со стороны организма.

Вероятно это различие обусловлено неодинаковыми изменениями обменных процессов.

Ранее нами была установлена определенная корреляция между функциональным состоянием нервной системы и энергетическим обменом, а также были проведены исследования обменных процессов в нервной ткани под влиянием ионизирующей радиации.

Многочисленные исследования, проведенные мною и моими сотрудниками, показали (1—15), что при облучении ЦНС различных животных одни звенья обменных процессов являются радиочувствительными, другие же — радиоустойчивыми, причем из всех исследованных нами обменных процессов наиболее радиочувствительными оказались окислительные. Так выяснилось, что в облученной нервной системе снижается потребление кислорода, падает содержание витамина В<sub>1</sub>, повреждается окислительный механизм использования глюкозы и процесс окислительного фосфорилирования, накапливаются лимонная, пировиноградная и молочная кислоты, нервные клетки претерпевают значительные морфологические изменения, и, в частности, изменение цитоплазмально-ядерного отношения, изменение числа,



формы и распределения митохондрий в нервных клетках, а также изменение изоэлектрической точки нуклеопротеидов митохондрий, изменение оптических свойств митохондрий, что выявляется уже в первые минуты после облучения. Нарушения обмена веществ и строения коррелируют с типичными нарушениями функций облученной нервной системы. Однако в нервной ткани, наряду с обменными процессами, чувствительными к ионизирующим излучениям, нами обнаружены и процессы весьма устойчивые. По крайней мере в ближайшие сроки после облучения к таковым относятся: гликолитический механизм обмена углеводов, практически не меняющееся содержание белков и нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), а также некоторых аминокислот (глутамин — глутаминовая кислота).

Нами установлено, что несмотря на значительное нарушение функций облученной нервной системы и повреждение ряда биохимических и физико-химических процессов в ней, мы всегда наблюдали восстановление функций нервной системы, биохимических и физико-химических процессов, которые находились в зависимости от применяющихся величин лучевого раздражителя; правда, это восстановление происходит на новом уровне, но близком к исходному состоянию.

По нашему мнению, восстановление функций облученной нервной системы происходит за счет устойчивых звеньев обмена веществ, о которых шла речь выше.

Говоря об устойчивости исследованных нами обменных процессов в облученной нервной ткани, мы должны всегда помнить, что это понятие относительное; так, например, хотя количество белка в ближайшие сроки после облучения нервной системы может и не меняться, качественные изменения, по всей вероятности, имеют место (изменение конформационных свойств белковых молекул и др.).

Обширный материал, полученный нами на большом количестве различных видов животных, позволил сделать вывод о том, что в основе радиочувствительности в конечном итоге лежат определенные звенья окислительных процессов.

Под влиянием ионизирующих излучений изменения окислительных процессов носят фазовый характер (11).

Нарушение процессов окислительного фосфорилирования в облученной нервной ткани обнаруживается сразу же после облучения, но особенно сильно они страдают на 2—3 день после облучения (рис. 1).

Из приведенного рисунка видно, что в митохондриях, выделенных из облученного мозжечка, значительно снижается потребление кислорода и нарушается утилизация неорганического фосфора; отношение  $P:O$  падает вдвое по сравнению с контролем. При таком разобщении дыхания с фосфорилированием снижается способность к образованию макроэргических соединений,

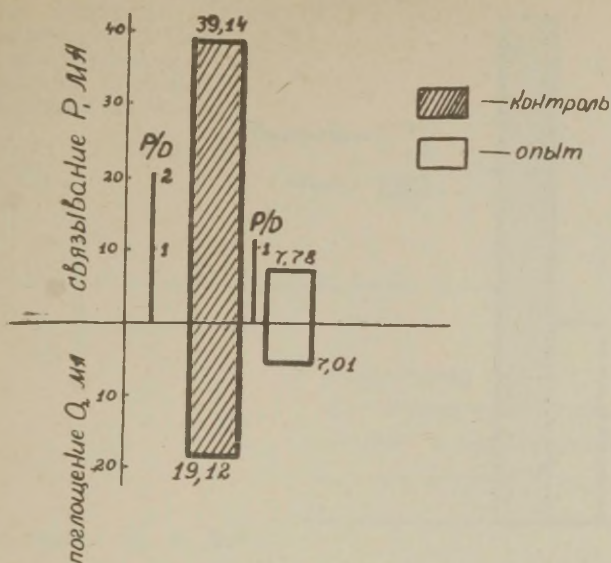


Рис. 1. Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозжечка морской свинки в норме и при облучении мозжечка 9 000 р на вторые сутки после облучения (средние данные 10 опытов).

что приводит к нарушению всего комплекса обменных процессов в нервной клетке и нарушению ее функций. В эти же сроки имеют место нарушения превращений пировиноградной кислоты, что выражается в значительном ее накоплении в облученной нервной ткани (рис. 2). Из рисунков 1 и 2 совершенно отчетливо видно, что нервная ткань находится в состоянии тяжелой аноксии; это, по нашему мнению, является причиной гибели части нервных клеток при действии на них относительно больших доз ионизирующей радиации.

Таким образом наш вывод, обоснованный большим фактическим материалом, коренным образом противоречит общепринятому в радиобиологии мнению о защитной роли гипоксии при облучении животных смертельными дозами радиации.

Для более углубленного подхода к решению вопроса о ведущей роли окислительных процессов при лучевом воздействии на нервную систему нами проведены две серии экспериментов: в первой серии экспериментов животным перед локальным облучением ЦНС вводились вещества, защищающие окислительные процессы от повреждающего действия радиации, а во второй серии — напротив, вводились ферментные яды, повреждающие окислительные процессы.

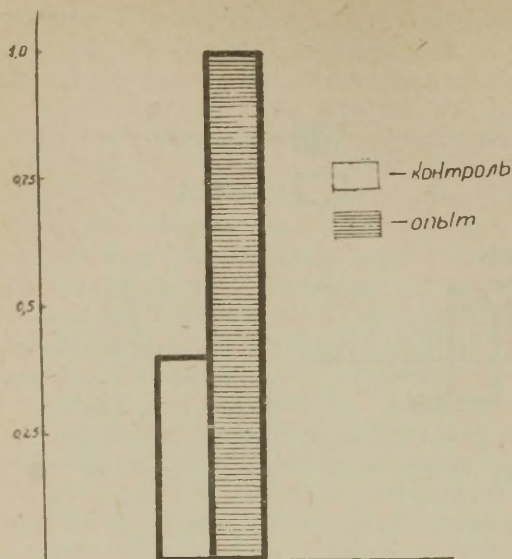


Рис. 2. Содержание пировиноградной кислоты в мозжечке на 2—3 сутки после облучения (в % на влажную ткань)

### Первая серия экспериментов

Животным за 1—2 часа до облучения парентерально вводили комплекс веществ (разработанный нами): гексоний, нембутал и дериват витамина В<sub>1</sub> — тиаминпропилдисульфид (алинамин). Алинамин по сравнению с витамином В<sub>1</sub> лучше проникает через клеточные мембраны, более легко фосфорилируется с образованием кокарбоксилазы и лучше фиксируется тканями.

Результаты этой серии экспериментов показали, что радиустойчивость нервной системы значительно повысилась, а окислительные процессы практически не были нарушены (рис. 3); на рисунке отчетливо видно, что гексоний и нембутал в сочетании с алинамином практически не нарушают процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из облученного мозжечка животных; хотя и имеется некоторое снижение потребления кислорода и небольшая задержка утилизации неорганического фосфора, но коэффициент Р:О остается таким же, как и у контрольных животных.

Исследования, в которых животным перед облучением вводились защитные вещества, показали, что в ткани мозжечка, взятой на биохимический анализ на 2—3 день после облучения, содержание витамина В<sub>1</sub> практически остается без изменений или даже несколько увеличено (рис. 4).

Из рис. 4 видно, что если в комплекс защитных веществ, вводимых животным перед облучением, входил витамин В<sub>1</sub>, то его содержание в облученной ткани мозжечка хотя и незначи-



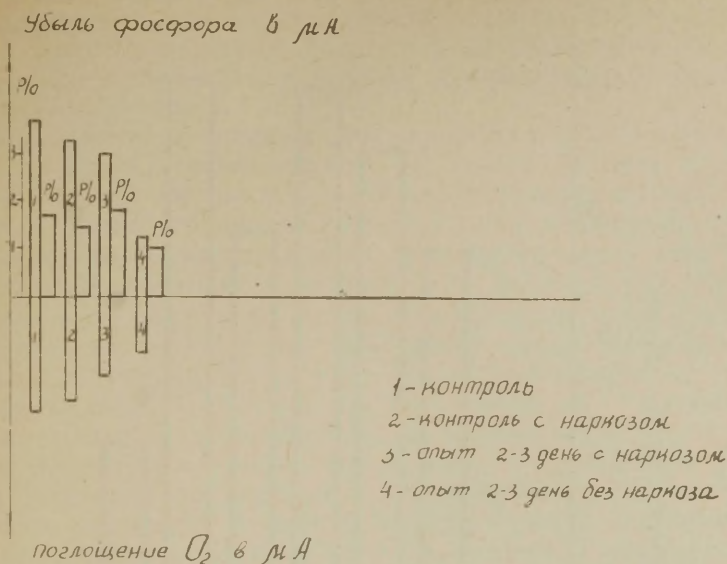


Рис. 3. Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозжечка морских свинок в норме и на 2—3 сутки после локального облучения мозжечка с применением защитных веществ и без них.

тельно, но все же снижалось (в среднем на 13%) по сравнению с содержанием его в мозжечке животных, которым вводили витамин  $B_1$ , но облучению не подвергали.

Совсем другую картину в содержании витамина  $B_1$  в облученном мозжечке мы наблюдали, когда в комплекс защитных веществ входил не витамин  $B_1$ , а тиаминпропилдисульфид (алин-амин). В этом случае содержание тиамина не только не снижается, а значительно увеличивается (в среднем на 35%) по сравнению с контролем. Более того, содержание витамина  $B_1$  в облученной нервной ткани животных, которым вводили тиаминпропилдисульфид, более устойчиво к действию ионизирующей радиации, чем при введении витамина  $B_1$  (рис. 4).

Следует подчеркнуть, что у таких животных мозжечковые расстройства не наблюдались ни в близкие, ни в отдаленные сроки (наблюдения за животными велись в течение 2,5 месяцев) после облучения (10). Отечность мозжечка или была незначительной, или ее не было совсем. В строении нервных клеток наблюдались лишь небольшие изменения.

Приведенные данные свидетельствуют в пользу нашего положения, что окислительные процессы играют ведущую роль в радиочувствительности нервной системы.

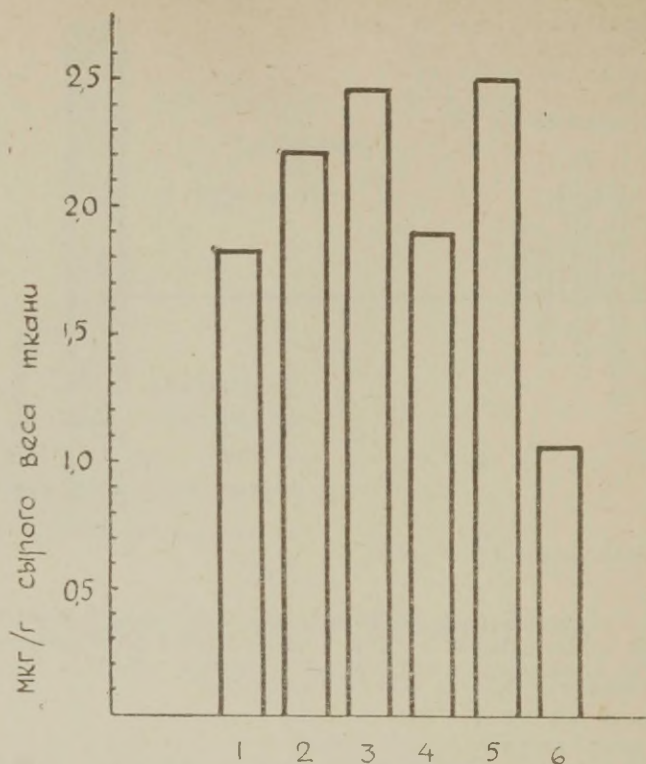


Рис. 4. Содержание витамина В<sub>1</sub> в облученном мозжечке животных.

1 — контроль; 2 — В<sub>1</sub> с наркотиками; 3 — нембутал-алинамин-гексоний; 4 — те же компоненты, что и во втором варианте + облучение; 5 — те же компоненты, что и в третьем варианте + облучение; 6 — В<sub>1</sub> после облучения без защитных веществ.

## Вторая серия экспериментов

Опыты проведены на собаках. В качестве ферментных ядов, нарушающих различные звенья окислительных процессов в нервной ткани применялись: мышьяковокислый натрий, блокирующий пируватоксидазную систему и являющийся конкурентом фосфата в процессе окислительного фосфорилирования; монофторацетат, тормозящий аконитазную реакцию цикла трикарбоновых кислот путем образования фторцитрата; монойодацетат, подавляющий превращение глюкозы на стадии образования триозофосфатов, а также угнетающий процесс окислительного фосфорилирования.

Растворы ядов нейтрализовались до рН 7,4 и вводились в подмозжечковую цистерну в пороговых дозах, вызывающих по-

явление изменений в функциональном состоянии нервной системы животных (1 мг мышьяковокислого натрия или мснйодацетата или же 50γ монофторацетата в 1 мл физиологического раствора). Перед введением растворов отсасывалось эквивалентное количество ликвора.

Исследование проводилось на нескольких группах животных. Одна группа животных отравлялась одним из ядов, у другой группы через 1 час после отравления локально облучался мозжечок, в третьей группе проводилось только локальное облучение мозжечка, четвертая группа была контрольной. Опытные и контрольные животные подбирались по весу, полу и возрасту.

Локальное облучение мозжечка проводилось на рентгеновском аппарате РУМ-1 по описанной ранее методике (11). Условия облучения: сила тока 15 ма; напряжение на трубке 210 кв, фильтры  $\text{Cu}$  — 0,5 мм,  $\text{Al}$  — 0,75 мм. Расстояние от трубки до головы животного 20 см, мощность дозы 192 р/мин. Время облучения в зависимости от дозы — 16,5 мин или 44 мин. Доза облучения, приходящаяся на поверхность головы, в этих условиях составляла 3 кюри и 8 кюри. Однако фотомные измерения дозы, поглощенной костями, мышцами, сосудами и кожей головы, показали, что она составляет около 50% общей дозы, т. е. фактически ткань мозжечка получала половинную дозу 1,5 и 4,0 кюри. Поэтому ниже в работе будут приводиться только фактические дозы радиации, поглощенные тканью мозжечка.

Радиочувствительность нервной ткани оценивалась по клиническим, биохимическим и гистологическим изменениям. Биохимическими тестами служило определение содержания лимонной и пировиноградной кислот, окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани облученного мозжечка.

Животные подвергались прижизненному охлаждению мозга и одновременному освобождению его сосудов от крови (7, 11). Для гистологических исследований в качестве контроля использовались и необескровленные животные.

Исследования проводились через 15—30 минут после облучения, т. е. через 2,0—2,5 часа после отравления. Применявшиеся биохимические методики описаны в предыдущих работах (8, 11, 12, 13). В предыдущих наших работах было показано, что при локальном облучении мозжечка большими дозами радиации (7,5—10,0 кюри на поверхность мозжечка) у животных появляется тот типичный комплекс мозжечковых расстройств, который наблюдается при экстирпации мозжечка. При меньших дозах облучения, а именно, при 1,5—4,0 кюри, применявшихся в данной работе, мозжечковые расстройства у собак не выявляются.

Ферментные яды, нарушающие окислительные процессы в



ткани мозжечка, употреблялись в пороговых дозах, вызывающих слабые изменения в функциях нервной системы.

Совместное облучение мозжечка собак в дозе 1,5—4,0 кюри и отравление одним из ядов приводило к явно выраженным расстройствам функций мозжечка, наблюдавшимся нами ранее лишь при облучении в дозах 7,5—10,0 кюри. Однако функциональные нарушения, возникающие при совместном отравлении и облучении, имели некоторую специфику, зависящую от применявшегося яда. Так, при отравлении мышьяковокислым натрием и облучении ригидность передних конечностей и запрокидывание головы назад выражены менее отчетливо, чем при отравлении монофторацетатом или монойодацетатом. Облучение на фоне отравления монофторацетатом кроме того приводит к сильно выраженному тремору всех мышц тела. При отравлении монойодацетатом и облучении тремор мышц тела незначителен.

Наши прежние исследования показали, что локальное облучение мозжечка в дозе 7,5—10,0 кюри приводит к значительному накоплению пировиноградной кислоты (рис. 2).

Данные по определению пировиноградной и лимонной кислот в облученном мозжечке собак при воздействии различных ядов представлены на рис. 5.

Применявшаяся в данных исследованиях доза облучения (4 кюри) незначительно увеличивала уровень пирувата по сравнению с нормой, а отравление мышьяковокислым натрием в дозе 1 мг приводило к небольшому накоплению пировиноградной кислоты. В случае отравления мышьяковокислым натрием и последующего облучения наблюдалось резкое нарастание исследуемого метаболита, что, очевидно, говорит о нарушении пируватоксидазной системы в этих условиях опыта (рис. 5).

При введении в подмозжечковую цистерну монофторацетата наблюдалось лишь небольшое повышение уровня пирувата, которое увеличивалось после облучения мозжечка (рис. 5). Аналогичные данные получены и при отравлении нервной ткани монойодацетатом (рис. 5).

Данные по определению лимонной кислоты при облучении мозжечка и отравлении его различными ядами представлены на рис. 5. Через 30 минут после облучения в дозе 4 кюри количество лимонной кислоты почти не менялось. При действии монойодацетата не отмечено сдвигов в содержании лимонной кислоты как при одном отравлении, так и при совместном воздействии яда и облучения. Отравление мышьяком вызывало некоторое снижение цитрата в ткани мозжечка, однако действие радиации на фоне отравления нивелировало этот эффект. При введении монофторацетата наблюдалось значительное накопление лимонной кислоты, что говорило о специфическом торможении аконитазной реакции цикла Кребса. Облучение на этом фоне

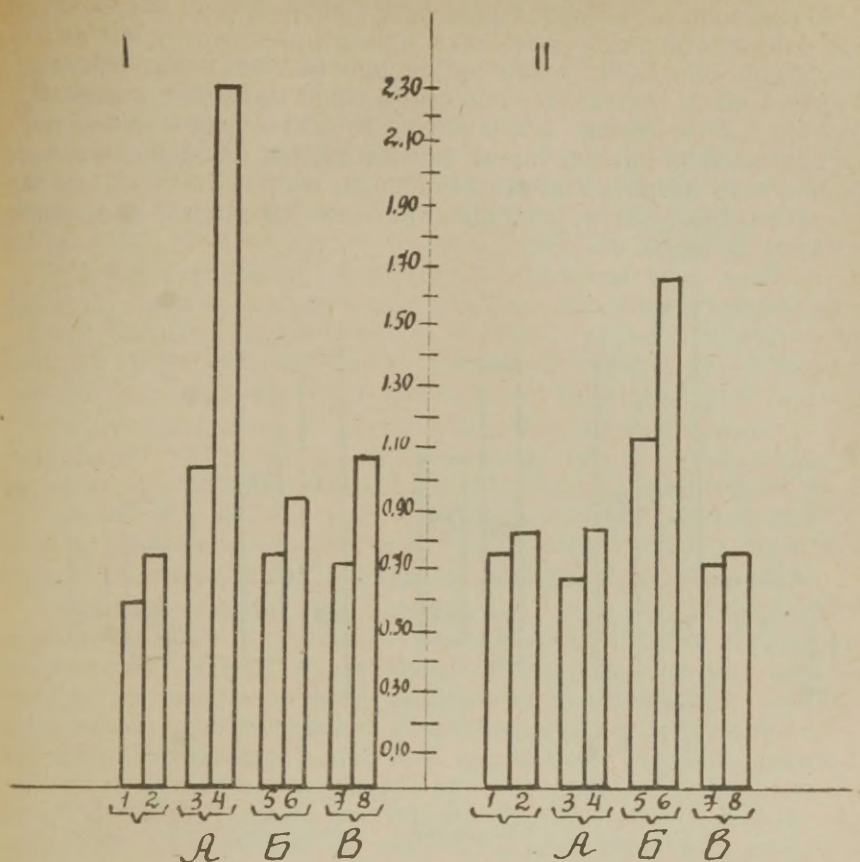


Рис. 5. Содержание пировиноградной и лимонной кислот в облученном мозжечке собак на фоне отравления ферментными ядами (мг% на влажную ткань) через 30 мин после облучения.

I — Содержание пировиноградной кислоты. II — Содержание лимонной кислоты. 1 — норма, 2 — облучение. А. Отравление мышьяковокислым натрием; 3 — одно отравление, 4 — отравление + облучение. Б. Отравление монофторацетатом; 5 — одно отравление, 6 — отравление + облучение. В. Отравление монойодацетатом; 7 — одно отравление, 8 — отравление + облучение.

приводило к еще большему накоплению цитрата в ткани мозжечка (рис. 5).

В ряде опытов доза облучения была снижена до 1,5 кюри; облучение в этой дозе не меняло содержания лимонной кислоты в мозжечке, но при совместном действии облучения и отравления монофторацетатом получен эффект усиления от двух воздействий, выразившийся в отчетливом накоплении цитрата.

Нами было показано, что большие дозы радиации вызывают серьезные нарушения окислительного фосфорилирования.

Изменения в окислительном фосфорилировании наблюдаются при отравлении ткани мозжечка монофторацетатом; эти изменения лишь несколько усиливаются при последующем облучении в дозе 4 кюри. Мышьяковокислый натрий приводит к несколько большим изменениям, а облучение в дозе 4 кюри совместно с отравлением резко нарушает окислительное фосфорилирование, сильно снижая потребление кислорода, сокращая убыль неорганического фосфата и разобщая тканевое дыхание и фосфорилирование (рис. 6).

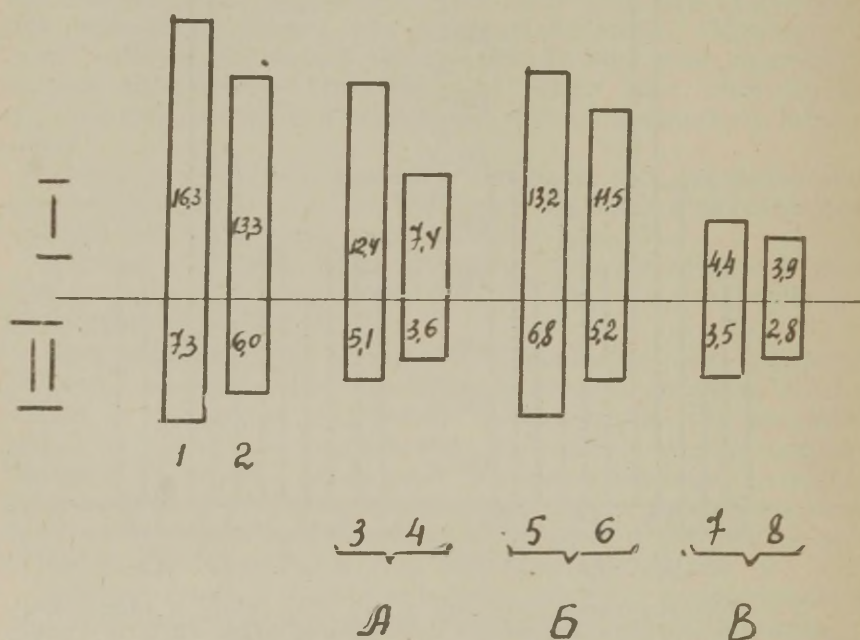


Рис. 6. Окислительное фосфорилирование в митохондриях мозжечка собак при действии ферментных ядов и облучения.

*I* — убыль неорганического фосфата в микрограмм-атомах. *II* — поглощение кислорода в микрограмм-атомах: 1 — норма, 2 — облучение в дозе 4 кюри. *A* — отравление мышьяковокислым натрием: 3 — одно отравление, 4 — отравление + облучение, *B* — отравление монофторацетатом: 5 — одно отравление, 6 — отравление + облучение. *B* — отравление монойодацетатом: 7 — одно отравление, 8 — отравление + облучение.

К еще более резкому угнетению окислительного фосфорилирования приводит отравление мозжечка монойодацетатом, усиливаемому при последующем облучении, что приводит в некоторых опытах к полному подавлению процесса. Результаты этих исследований представлены на рис. 6. Следует подчеркнуть, что эти изменения процесса окислительного фосфорилирования отчетливо выражены уже через 30 минут после облучения нервной ткани.



## Обсуждение результатов

Применение ферментных ядов, действующих на определенные звенья окислительных процессов в нервной ткани, приводило к нарушению этих звеньев в отравленном мозжечке. Так, мышьяковокислый натрий вызывал накопление пировиноградной кислоты и торможение окислительного фосфорилирования, монофторацетат приводил к накоплению лимонной кислоты, монойодацетат угнетал окислительное фосфорилирование.

Облучение в дозах 1,5—4,0 кюри, само по себе лишь в небольшой степени нарушающее эти же процессы, приводило к гораздо большим нарушениям в случаях предварительного воздействия ферментными ядами. Происходила как бы суммация воздействий, приводящая к повышению радиочувствительности.

Это же повышение радиочувствительности обнаружено и при клинических наблюдениях. Облучение в дозе 1,5—4,0 кюри, не вызывавшее у собак заметных функциональных нарушений после применявшихся ферментных ядов, приводило к появлению типичных мозжечковых расстройств, наблюдавшихся нами при гораздо больших дозах облучений порядка 7,5—10,0 кюри.

Наблюдавшееся нами повышение радиочувствительности нервной системы в условиях ее предварительного отравления ферментными ядами, нарушающими различные звенья окислительных процессов, по всей видимости, подтверждает правильность нашего предположения о ведущей роли повреждения окислительных процессов в лучевом поражении нервной ткани, а именно: повреждения процессов окислительного фосфорилирования, пируватоксидазной системы и лимоннокислого цикла. Однако наиболее страдающим звеном, по всей видимости, является нарушение превращений одного из главных путей ее утилизации — окислительного декарбоксилирования. Это можно предположить на основании некоторых данных, полученных нами в прежних работах:

1) накопление пировиноградной кислоты в облученной ткани мозга сопровождается падением содержания тиамина;

2) пируват, добавленный к гомогенатам и митохондриям из облученной ткани, почти не используется ими и не восстанавливает нарушенного потребления кислорода. Добавление кокарбоксилазы повышает утилизацию кислорода облученной нервной тканью.

Наконец, данные, изложенные в настоящей работе, показывают, что действие специфического ингибитора пируватоксидазной системы — арсенита — совместно с облучением приводит к значительно большему накоплению пировиноградной кислоты, чем при облучении или при одном отравлении.

Таким образом, мы снова, еще раз подтверждаем высказан-

ное нами положение о ведущей роли нарушения окислительных процессов в лучевой реакции нервной ткани (2—14).

Еще в 1962 г. мы писали: «В литературе широко распространено мнение, что гипоксия является одним из механизмов защиты животного организма от действия ионизирующих излучений. Это мнение основано на том, что некоторые вещества, вводимые животным перед облучением, вызывая гипоксию, предохраняют животных от радиации. Основным критерием для такого суждения является выживаемость животного и картина крови. Состояние нервной системы таких животных почти не изучалось.» (11).

Но именно ткань мозга крайне чувствительна к недостатку кислорода, и аноксия сама по себе для нее губительна. Поэтому на фоне аноксии действие ионизирующей радиации на нервную систему должно было, по нашему мнению, не ослабляться, а усиливаться.

Весь новый материал, полученный нами с несомненностью подтвердил губительность аноксии для нервных клеток в условиях облучения.

В последние годы наши данные о том, что гипо- и аноксия не могут служить защитой нервной системы при облучении, получают все новые подтверждения в работах зарубежных ученых (16).

Пересматривая значение гипоксии в отношении к нервной системе, мы допускаем, что она может оказывать защитное действие на ткани, устойчивые к недостатку кислорода, например — мышечную.

Однако неэффективность защиты нервной системы сводит на нет весь защитный эффект гипоксии в целом, и мы считаем, что уже имеется достаточно убедительных данных для пересмотра значения гипо- и аноксии в роли протекторов.

## Резюме

В работе изучалось действие различных ферментных ядов совместно с локальным рентгеновским облучением мозжечка и без облучения. Результаты оценивались по содержанию пириновинной, лимонной кислот, состоянию процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях, а также по клиническому состоянию животных.

Показано, что предварительное введение веществ, блокирующих различные звенья окислительных процессов в ткани мозга, приводит к значительному повышению радиочувствительности нервной системы при последующем локальном облучении. Это подтверждает наши прежние работы, говорящие о том, что радиочувствительность нервной системы обусловлена состоянием ее окислительных процессов.

На основании данных прежних исследований, а также результатов, изложенных в настоящей работе, мы считаем, что гипоксия не может служить защитой от повреждающего действия радиации, напротив, она усугубляет губительное действие ионизирующей радиации на нервную систему.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Минаев П. Ф., ДАН СССР, **95**, 693, 1954.
2. Минаев П. Ф., В кн.: Биохимия нервной системы, Киев, 171, 1954.
3. Минаев П. Ф., Журнал общей биологии, **15**, 401, 1954.
4. Минаев П. Ф., Скворцова Р. И., В сб.: Вopr. биохимии нервн. системы, Киев, 289, 1957.
5. Скворцова Р. И., Минаев П. Ф., В сб.: Фосфорилирование и функция, Л., 145, 1960.
6. Минаев П. Ф., Антонова А. М. и др., Тр. конф. по использ. атомн. энерг. в мирн. целях, Ташкент, 53, 1961.
7. Минаев П. Ф., Чухрова А. И., Укр. биохим. ж., **33**, 431, 1961.
8. Минаев П. Ф., Логвинова О. Ф., Радиобиология, **2**, 259, 1962.
9. Минаев П. Ф., Чухрова А. И., Радиобиология, **2**, 450, 1962.
10. Минаев П. Ф., Мощинский П., Скоробогатова Е. П., ДАН СССР, **193**, 976, 1962.
11. Минаев П. Ф., Влияние ионизирующих излучений на центральную нервную систему. Монография, изд. АН СССР, 1962.
12. Минаев П. Ф., Чухрова А. И., Антонова А. М., III Всесоюзная конфер. по биохим. нервной системы, Ереван, 561, 1962.
13. Скворцова Р. И., Канторова В. И., Логвинова О. Ф., III Всесоюзн. конф. по биохим. нервн. сист., Ереван, 607, 1962.
14. Минаев П. Ф., Логвинова О. Ф., Миронова А. П., Чухрова А. И., ДАН СССР, **155**, 1209, 1964.
15. Канторова В. И., Радиобиология (в печати).
16. Shewell W. J., Nature, **208**, 904, 1965.



## ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБМЕНА НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА ПРИ ГИПОКСИИ, ДЕЙСТВИИ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА, АМИНАЗИНА И ХЛОРАЛГИДРАТА

Н. Д. Ещенко, Л. М. Крестникова, Ф. Е. Путилина

Лаборатория биохимии нервной системы Физиологического института  
им. А. А. Ухтомского Ленинградского университета, Ленинград

В нормальных условиях в животном организме существует теснейшая взаимосвязь между процессами окисления, аккумуляции и расходования энергии. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) является универсальной окислительной системой, связанной с накоплением макроэргических соединений. В ходе цикла Кребса выделяется приблизительно  $\frac{2}{3}$  всей энергии, освобождающейся при окислении белков, жиров и углеводов (1). Поэтому по интенсивности обмена компонентов цикла Кребса можно судить об окислительных процессах, происходящих в органах и тканях животного организма.

Особый интерес представляет исследование ЦТК в головном мозге, который характеризуется высоким уровнем энергетического обмена и крайне чувствителен к нарушению процессов окисления. Однако литературные данные по количественному содержанию и интенсивности обмена лимонной,  $\alpha$ -кетоглutarовой, янтарной, яблочной и других кислот цикла как в мозгу, так и в других органах даже в нормальных условиях малочисленны и противоречивы (2—7). Это связано прежде всего с отсутствием до настоящего времени надежных и простых методов определения отдельных органических кислот в животных тканях. Еще меньше изучены изменения обмена компонентов цикла Кребса при различных воздействиях, в частности, при гипоксии, при действии 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) и др.

Как известно, при гипоксии уменьшается потребление кислорода мозгом (8, 9), а 2,4-ДНФ, разобщая окислительное фосфорилирование, наоборот, несколько повышает потребление кислорода целым организмом и отдельными органами (10, 11). Эти изменения могут отразиться на интенсивности обмена компонентов цикла Кребса.

В противоположность действию 2,4-ДНФ и гипоксии, по данным ряда авторов, аминазин и хлорагидрат оказывают лишь небольшое действие на дыхание мозга *in vivo* (12—14).

В данной работе мы изучали влияние гемической формы гипоксии, введения 2,4-ДНФ, аминазина или хлоралгидрата на количество и удельную активность (У.А.) ряда компонентов ЦТК.

### Методика исследования

Опыты проводили на белых крысах весом 100—150 г. Гипоксию вызывали подкожным введением нитрита натрия в количестве 15 мг на 100 г веса животного. Динитрофенол вводили интраперитонеально из расчета 3 мг/100 г веса. Длительность опытов с нитритом натрия и 2,4-ДНФ была 45 минут.

Аминазин и хлоралгидрат использовали для подкожных инъекций в дозе 30 мг и 50 мг на 100 г веса соответственно; продолжительность опытов при этом была 60 минут. Животных замораживали жидким кислородом, после чего брали навески ткани мозга для определения количества АТФ,  $\alpha$ -кетоглутаровой и янтарной кислот, а также для определения количества и У.А. лимонной и пировиноградной кислот.

Определение содержания лимонной кислоты проводили по методу Нательсона, Пинкуса и Лугового (15), пировиноградной — по методу Фридемана и Хаугена (16),  $\alpha$ -кетоглутаровой — по методу Тарве (17), янтарной — по методу Роджерса (18). Количество АТФ определяли энзиматически с помощью «Берингеровских тестов».

При исследовании У.А. лимонной и пировиноградной кислот в качестве предшественника использовали пируват- $2\text{-C}^{14}$ , который вводили подкожно по 25 мкюри на 100 г веса. Продолжительность радиоактивной экспозиции была 15 и 30 минут. В этих опытах лимонную кислоту выделяли в чистом виде с помощью бумажной хроматографии (19), а пировиноградную осаждали в виде 2,4-динитрофенилгидразона (19).

Полученные результаты обработаны статистически. В таблицах приведены значения среднего арифметического ( $M$ ) и ошибки среднего арифметического ( $\pm m$ ), а также показатель достоверности  $P$ .

### Результаты и их обсуждение

В первой серии опытов мы определяли изменение содержания АТФ. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

Из представленных данных видно, что введение животным аминазина или хлоралгидрата не вызывало статистически достоверных изменений уровня АТФ в мозгу. Напротив, при гипоксии и действии 2,4-ДНФ содержание АТФ заметно снижалось: при гипоксии в среднем на 30%, после введения 2,4-ДНФ — приблизительно на 36%.

Хотя при гипоксии и при действии 2,4-ДНФ наблюдались однозначные изменения уровня АТФ, механизм этих изменений различен. У гипоксических животных замедление синтеза АТФ, вероятно, объясняется угнетением окислительных процессов. В случае введения 2,4-ДНФ это происходит из-за разобщения окислительного фосфорилирования.

мг % Р<sub>i</sub>

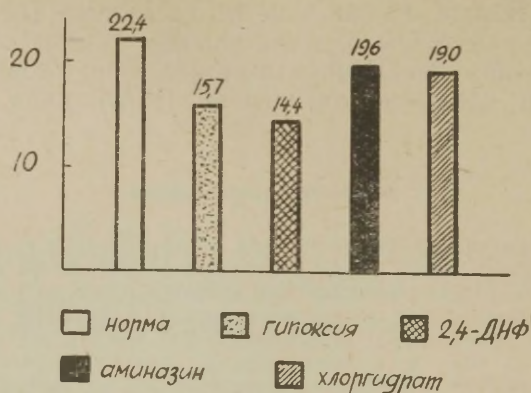


Рис. 1. Содержание АТФ в мозгу крыс в норме и при различных воздействиях.

В головном мозгу основное количество АТФ образуется за счет фосфорилирования, сопряженного с окислением компонентов ЦТК. Поэтому несомненный интерес представляло исследовать изменения, наступающие в обмене кислот цикла Кребса.

Наиболее близким предшественником компонентов ЦТК является пировиноградная кислота, так как основной путь окисле-

Таблица 1  
Содержание пировиноградной кислоты в мозгу крыс (мг%)

№№ п/п	Норма	Гипоксия	2,4-ДНФ	Аминазин	Хлоралгидрат
1	1,65	2,76	7,31	1,26	1,30
2	1,02	2,21	5,97	1,28	1,25
3	1,54	2,43	6,95	1,17	1,63
4	0,95	2,79	6,02	1,36	1,44
5	1,11	2,89	6,69	1,15	1,57
6	1,47	2,29	6,15	1,14	1,36
7	1,21	2,46	6,52	—	1,77
8	1,40	2,82	6,44	—	1,20
9	1,32	2,81	6,33	—	0,86
10	1,30	2,36	6,31	—	0,76
$M \pm m$	$1,30 \pm 0,07$	$2,58 \pm 0,07$ $P < 0,01$	$6,47 \pm 0,13$ $P < 0,001$	$1,23 \pm 0,01$ $P > 0,1$	$1,31 \pm 0,01$ $P > 0,1$



ния пирувата проходит именно через цикл Кребса. Результаты опытов по определению содержания пировиноградной кислоты в мозгу в норме и при исследуемых воздействиях приведены в таблице 1.

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что значительные изменения в уровне пирувата наблюдались лишь при действии 2,4-ДНФ и при гипоксии. При этих воздействиях содержание пировиноградной кислоты возрастало примерно в 2 раза (гипоксия) и почти в 4,5—5,0 раз после инъекции 2,4-ДНФ. Введение животным аминазина или хлоралгидрата не отражалось на количестве пировиноградной кислоты в головном мозгу.

Увеличение содержания пирувата в мозгу при гипоксии и при действии 2,4-ДНФ можно объяснить различными причинами. Введение животным нитрита натрия вызывает гипоксию и приводит к усилению гликолитических процессов. Образовавшаяся пировиноградная кислота, с одной стороны, превращается в молочную за счет активации лактатдегидрогеназной реакции. Другой путь превращения пирувата — окислительное декарбоксилирование — замедляется из-за недостатка кислорода (20, 21). Следствием этого должно быть снижение уровня лимонной кислоты (см. табл. 2).

Резкое повышение количества пирувата после введения 2,4-ДНФ происходит, по-видимому, из-за усиления гликолитических процессов, в результате чего содержание гликогена в мозгу снижается почти в 2 раза (22). При этом окислительные процессы не затормаживаются, как в случае гипоксии, а напротив, усиливаются, о чем свидетельствуют данные по содержанию лимонной кислоты в мозгу, представленные в таблице 2.

Таблица 2

Содержание лимонной кислоты в мозгу крыс (мг%)

№№ п/п	Норма	Гипоксия	2,4-ДНФ	Аминазин	Хлоралгидрат
1	5,60	3,80	13,93	6,60	7,10
2	6,01	4,00	14,25	8,15	5,73
3	6,18	5,09	14,80	7,85	5,57
4	6,67	4,31	22,03	5,54	6,40
5	6,19	4,50	18,06	6,86	5,50
6	6,80	3,08	17,58	6,30	5,74
7	6,25	5,11	19,36	6,70	6,36
8	5,80	5,31	16,56	7,13	6,30
9	7,12	5,90	17,62	5,77	5,42
10	5,76	4,50	18,32	8,10	5,68
$M \pm m$	$6,24 \pm 0,14$	$4,56 \pm 0,07$ $P < 0,01$	$17,25 \pm 0,79$ $P < 0,001$	$6,90 \pm 0,04$ $P > 0,05$	$5,98 \pm 0,06$ $P > 0,05$

Из таблицы 2 видно, что при гипоксии содержание лимонной кислоты снижается в среднем на 25%, а введение 2,4-ДНФ вызывало увеличение его почти в 3 раза. Аминазин и хлоралгидрат не оказывали заметного действия на уровень лимонной кислоты в мозгу; однако, нужно отметить, что они вызывают резкое повышение количества цитрата в печени (23).

Кроме того, мы наблюдали повышение количества другого компонента ЦТК — янтарной кислоты — в мозгу после инъекции животным 2,4-ДНФ (24). Если в норме содержание янтарной кислоты, в среднем, составляло  $13,05 \pm 0,75$  мг%, то после введения 2,4-ДНФ оно повышалось до  $28,94 \pm 0,78$  мг%, т. е. увеличивалось более, чем в 2 раза.

Что касается  $\alpha$ -кетоглutarовой кислоты, то ни одно из исследованных нами воздействий не оказывало влияния на содержание ее в головном мозгу (табл. 3).

Таблица 3

Содержание  $\alpha$ -кетоглutarовой кислоты в мозгу крыс (мг%)

№№ п/п	Норма	Гипоксия	2,4-ДНФ	Аминазин	Хлоралгидрат
1	1,66	1,40	1,82	1,33	1,70
2	1,60	1,66	1,98	1,83	1,67
3	1,43	1,80	2,00	1,73	1,23
4	1,51	1,80	1,88	1,43	1,87
5	1,50	2,00	1,63	1,50	1,17
6	1,63	1,60	1,78	1,52	1,70
7	1,40	1,64	—	1,52	1,70
8	1,27	1,80	—	1,53	1,83
$M \pm m$	$1,50 \pm 0,04$	$1,71 \pm 0,07$ $P > 0,05$	$1,75 \pm 0,06$ $P > 0,05$	$1,56 \pm 0,03$ $P > 0,1$	$1,62 \pm 0,05$ $P > 0,1$

Относительно постоянный уровень  $\alpha$ -кетоглutarовой кислоты, вероятно, поддерживается благодаря высоко активным в мозговой ткани трансаминазным системам, осуществляющим взаимопревращения  $\alpha$ -кетоглutarата и глутамата, а также за счет функционирования системы  $\alpha$ -кетоглutarат —  $\gamma$ -аминомасляная кислота.

На основании представленных выше данных по количественному содержанию АТФ, пировиноградной, лимонной и  $\alpha$ -кетоглutarовой кислот можно сказать, что нарушение цикла Кребса в головном мозгу происходит после воздействия 2,4-ДНФ или при гипоксии.

Несмотря на то, что оба эти воздействия приводили к уменьшению содержания АТФ в головном мозгу, влияние их на интенсивность обмена одного из компонентов ЦТК — лимонной

кислоты — не одинаково. Гипоксия вызывала замедление окислительных процессов, а инъекция животным 2,4-ДНФ, напротив, усиливала их. Это подтверждается результатами опытов по определению У.А. лимонной кислоты, проведенных с помощью радиоактивного пирувата-2С<sup>14</sup>. Данные этой серии опытов представлены в таблице 4.

Таблица 4

У.А. лимонной кислоты в мозгу после введения пирувата-2С<sup>14</sup>  
(имп/мин/мг «С»)

№№ п/п	Длительность радиоактивной экспозиции				
	15 минут		30 минут		
	Норма	2,4-ДНФ	Норма	Гипоксия	2,4-ДНФ
1	582	2202	1342	616	1390
2	790	1596	2000	652	1243
3	551	2315	1415	592	1116
4	714	1707	2089	889	1454
5	645	1968	1569	—	1305
6	572	1870	1674	—	1195
М ± m	642 ± 39	1943 ± 113 P < 0,001	1681 ± 126	687 ± 69 P < 0,001	1284 ± 52 P < 0,01

Данные, приведенные в таблице 4, показывают, что гипоксия вызывала резкое снижение У.А. лимонной кислоты — в среднем в 2,4 раза по сравнению с нормой. В опытах с введением 2,4-ДНФ, при 15-минутной радиоактивной экспозиции, У.А. цитрата была выше, чем в норме приблизительно в 3 раза. При 30-минутной экспозиции У.А. лимонной кислоты после инъекции животным 2,4-ДНФ несколько снижалась по сравнению с нормой. Это можно объяснить тем, что У.А. самой пировиноградной кислоты, которая является ближайшим предшественником лимонной кислоты, к этому времени резко уменьшалась по сравнению с нормой — в среднем в 5 раз (рис. 2).

Изменение интенсивности использования пировиноградной кислоты для синтеза лимонной при гипоксии и действии 2,4-ДНФ отчетливо видно при расчете относительной удельной активности (О.У.А.) цитрата (рис. 3). О.У.А. — это отношение У.А. лимонной кислоты к У.А. пировиноградной кислоты. В данном случае О.У.А. цитрата в норме при 15-минутной радиоактивной экспозиции условно принималась за единицу.

Как видно из рисунка 3, при гипоксии уменьшается включение радиоактивного пирувата в лимонную кислоту примерно в 2 раза. Введение 2,4-ДНФ, напротив, усиливало использова-



Имп/мин/мг "С"

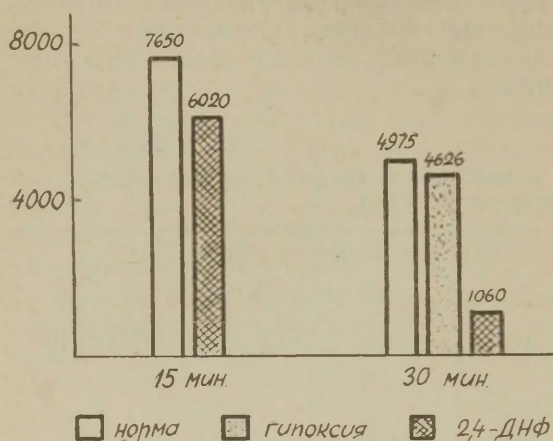


Рис. 2. У.А. пировиноградной кислоты в мозгу крыс в норме, при гипоксии и действии 2,4-ДНФ.

О.У.А.

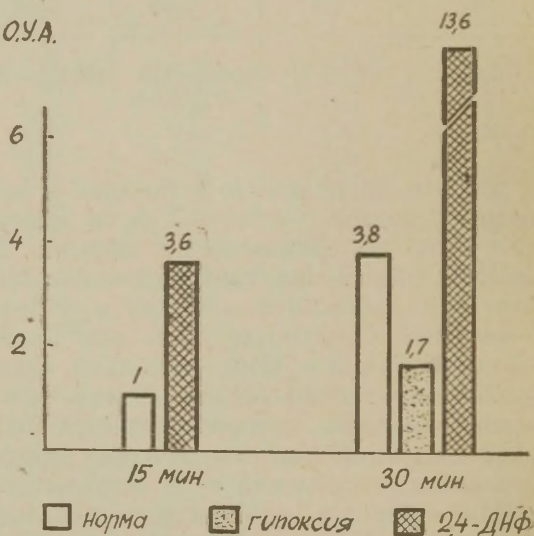


Рис. 3. О.У.А. лимонной кислоты в мозгу крыс после введения пирувата-2C<sup>14</sup>.

ние пирувата для синтеза лимонной кислоты в среднем в 3,5 раза. Эти данные еще раз подтверждают тот факт, что гипоксия замедляет интенсивность окислительных процессов в цикле Кребса, а 2,4-ДНФ повышает ее.

В заключение необходимо отметить, что на основании данных, полученных только при исследовании количества АТФ и кислот цикла Кребса, нельзя сделать вывод, что аминазин и хлоралгидрат не вызывают изменений интенсивности обмена

Имп/мин/мг "С"

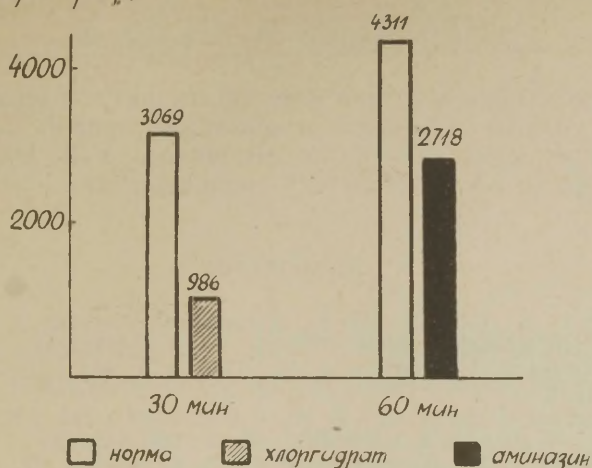


Рис. 4. У.А. лимонной кислоты в мозгу крыс в норме и при действии аминазина и хлоралгидрата (опыты с глюкозой- $1C^{14}$ ).

компонентов ЦТК. Результаты определения У. А. лимонной кислоты в опытах с глюкозой- $C^{14}$  показали, что после введения аминазина или хлоралгидрата У. А. цитрата отчетливо менялась (23). Из данных, приведенных на рисунке 4, видно, что в опытах с 30-минутной экспозицией У. А. лимонной кислоты после введения хлоралгидрата снижалась почти в 3 раза по сравнению с нормой. У. А. цитрата в опытах с аминазином через 1 час после введения изотопа была ниже, чем в норме приблизительно в 1,6 раза.

## Выводы

При гипоксии уровень пирувата в головном мозгу крыс повышался в среднем в 2 раза по сравнению с нормой. Количество лимонной кислоты, напротив, снижалось на 25%; установлено уменьшение примерно в 2,4 раза У. А. цитрата. Эти данные свидетельствуют о замедлении цикла Кребса при гипоксии, в результате чего содержание АТФ в мозгу снижалось в среднем на 30%.

Введение животным 2,4-ДНФ вызывало увеличение содержания пирувата в 4,5--5,0 раз, лимонной кислоты — почти в 3 раза и янтарной кислоты — более чем в 2 раза. У. А. цитрата превышала норму в среднем в 3 раза. Эти данные указывают на усиление окислительных процессов в головном мозгу под

влиянием 2,4-ДНФ. После инъекции 2,4-ДНФ наступало разобщение окислительного фосфорилирования, в результате чего содержание АТФ в головном мозгу снижалось в среднем на 30%.

При действии аминазина и хлоралгидрата содержание АТФ, пировиноградной, лимонной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот в головном мозгу крыс заметно не изменялось. У.А. лимонной кислоты в опытах с глюкозой- $1C^{14}$  уменьшалась.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кребс Г. А., Корнберг Г., Превращение энергии в живых системах, ИЛ, Москва, 1959.
2. Frochman C. E., Orten J. M., Smith A. H., J. Biol. Chem., **193**, 277, 1951.
3. Frochman C. E., Orten J. M., J. Biol. Chem., **216**, 795, 1955.
4. Lees H., Kuypers A. C., J. Biol. Chem., **225**, 641, 1957.
5. Marshall L. M., Donaldson K. O., Experientia, **12**, 472, 1956.
6. Gangloff E. C., Orten J. M., Smith A. H., J. Biol. Chem., **235**, 1900, 1960.
7. Krebs H. A., Chemical Pathways of Metabolism, **1**, 109, 1954.
8. Прохорова М. И., Бродская Н. И., Губайдулина Д. Х., Золоторева А. Н., Корвацкая А. М., Ученые записки ЛГУ, **43**, 272, 1957.
9. Мак Ильвейн Г., Биохимия и центральная нервная система, ИЛ, Москва, 1962.
10. Slater E. C., Lewis S. E., Biochem. J., **58**, 337, 1954.
11. Нейфах С. А., Здродовская Е. П., Биохимия, **26**, 1040, 1961.
12. McIlwain G., Greengard O., J. Neurochem., **1**, 348, 1957.
13. Luštinec K., Physiol. Bohemoslovenica **11**, 343, 1962.
14. Eiduson S., Geller E., Yuwiler A., Eiduson B. T., Biochemistry and Behavior, Toronto-New-York-London, 1964.
15. Natelson S., Pincus J. B., Lugovoy J. K., J. Biol. Chem., **175**, 745, 1948.
16. Friedeman A. D., Naugen G. E., J. Biol. Chem., **147**, 415, 1943.
17. Тарве У. С., Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, Ереван, 271, 1963.
18. Rodgers K., Biochem. J., **80**, 240, 1961.
19. Прохорова М. И., Тупикова З. Н., Методы определения радиоактивного углерода. Изд. ЛГУ, 1959.
20. Путилина Ф. Е., Автореферат канд. диссертации, ЛГУ, 1965.
21. Путилина Ф. Е., Сб.: Нервная система, **7**, 1966 (в печати).
22. Ещенко Н. Д., Сб.: Нервная система, **7**, 1966 (в печати).
23. Крестникова Л. М., Сб.: Нервная система, **7**, 1966 (в печати).
24. Ещенко Н. Д., Сб.: Нервная система, **8**, 1967 (в печати).



# МЕДИАТОРЫ И БИОГЕННЫЕ АМИНЫ В МОЗГУ И ИХ ОБМЕН

---

## О БИОХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРАХ ВЗАИМОСВЯЗИ В НЕЙРО-ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЕ

А. М. Утевский

Кафедра биохимии Харьковского медицинского института, Харьков

В настоящей работе сделана попытка обобщить некоторые данные эндокринологии и биохимии нервной системы и рассмотреть в аспекте этих данных результаты наших исследований обмена и функции катехоламинов.

Две наиболее химические ветви физиологии — учение о медиаторах нервной системы и учение о гормонах — развивались и развиваются в значительной степени изолированно друг от друга. Между тем обе эти области знаний рассматривают, по сути, одну и ту же проблему, а именно: химическую передачу нервных сигналов. Как известно, нервная система осуществляет свое влияние на эффекторные органы двумя видами биохимических факторов: медиаторами и гормонами. Первые действуют кратковременно и очень близко от места их образования, локально. Вторые действуют в течение более длительного времени и на сравнительно большом расстоянии от места образования, дистантно. Медиаторы и гормоны — это два основных биохимических «плеча» нервной системы.

Нейро-гуморальная регуляция включает обычно ряд сегментов, осуществляющих свою функцию передачи сигнала с помощью различных биохимических факторов. Это нейросекреты гипоталамуса, оказывающие влияние на выработку тропных гормонов гипофизом и являющиеся как бы «переводчиками» сигналов с языка нервной системы на язык эндокринных органов (1); это тропные гормоны аденогипофиза, стимулирующие образование и секрецию биохимических «передатчиков» следующего сегмента, например, кортикостероидов или йодированных тиронинов; это, наконец, те гормоны, которые осуществляют последний этап непосредственной передачи химического сигнала эффекторному органу. Разумеется, рамки действия каждого сег-

мента далеко не абсолютны, нейросекреты и тропные гормоны могут проявлять свое действие не только в строгой последовательности сегментов нейрогуморальной передачи, но и иными путями, например, непосредственно влияя на обмен, на функцию эффекторных органов и т. д. Между сегментами нейрогуморальной передачи устанавливаются сложные взаимоотношения, обратные связи. Проводниково-медиаторная часть нервной системы также сегментирована морфологически, биохимически и функционально, что особенно выражено в ее синаптических структурах.

Возникает вопрос, как «общаются» между собой последовательные сегменты нейро-эндокринной системы, какими химическими соединениями «общаются» нейрон с нейроном, нейрон с эндокринной клеткой, эндокринный орган с другим эндокринным органом и, наконец, нейрон и железа внутренней секреции с эффекторными органами.

Обращает на себя внимание своеобразная биохимическая специализация активных факторов различных сегментов. Нейросекреты — это обычно пептиды, часто не очень крупные — олигопептиды. Тропные гормоны также относятся к пептидам, некоторые из них по своим молекулярным параметрам приближаются к белкам. Гормоны представлены целым арсеналом химических соединений, мы находим среди них белки, пептиды, производные отдельных аминокислот (тирозина), стерины. Периферическая медиация осуществляется, как известно, ацетилхолином и норадреналином. Центральная медиация (или аналогичный процесс) обеспечивается такими веществами, как ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин, гамма-аминомасляная к-та и др. Таким образом, «общение» нейрона с нейроном, а также нейрона с эффекторным органом происходит с помощью низкомолекулярных соединений, преимущественно биогенных аминов и их производных. Прямое «общение» между ЦНС и эндокринным органом (гипоталамус — гипофиз), а также между гипофизом и другими эндокринными органами осуществляется белками и пептидами. Интересно, что стерины не являются непосредственно ни медиаторами, ни нейросекретами, ни тропными гормонами, хотя опосредованно могут участвовать в медиации («пермиссивная» функция кортикостероидов в отношении катехоламинов, 2—4).

Низкомолекулярные медиаторы обычно связаны с белками, «протендизированы» и, освобождаясь, переходят из «мест запасаения» на новые белки, осуществляя таким образом связь между белками нервной системы и белками — рецепторами эффекторного органа. В случае нейросекрета мы имеем дело с миграцией, экспортом из нервной клетки самого регуляторного белка. Еще более развита миграция регуляторных белков в эндокринных сегментах нейрогуморальной системы. Можно представить себе,



что регуляторные белки или движутся сами, или передают сигнал о своих конформационных изменениях с помощью подвижных низкомолекулярных соединений. Эти явления отчасти напоминают давно знакомые нам процессы взаимодействия ферментов, «общение» фиксированных ферментов с помощью низкомолекулярных коферментов, в одних случаях, и миграцию самих каталитических белков, в других.

Биорегуляция, как и биокатализ, развивалась от малоэффективного и малоспецифического к более эффективному и специфическому. При этом эффективность и специфичность развивались взаимосвязанно и взаимообусловленно. Каковы же наиболее общие пути повышения специфичности «химических регуляторов физиологических функций»? Нам кажется, что, во-первых, это специфичность химической структуры «регуляторов» и здесь, разумеется, первое место принадлежит белкам. Этот тип специфичности регуляции требует экспорта из клетки регуляторного белка. Второй тип — это специфичность пути, то есть морфо-физиологической структуры, ему в определенной степени соответствуют медиаторы. Белки, находящиеся в сложных комплексах с ионами, липоидами и т. д., передают информацию рецепторам, не покидая нейрона.

Можно высказать предположение, что одно из важных последствий развития нервной системы — это возникновение условий для ограничения выхода белка из нейронов. Нервная система функционирует преимущественно с помощью небольших молекул, компенсируя недостаточность специфичности химической структуры «передатчика» высокой специфичностью пути (или «стыка» путей), то есть специфичностью фиксированных протеиновых и протейдных макромолекул, конформационные изменения которых передаются низкомолекулярными медиаторами и нейrogормонами.

Медиаторная и гормональная функции нервной системы обеспечиваются различными в химическом отношении структурами. Исключением являются катехоламины (КА), участвующие как в медиаторных, так и гормональных процессах. Эти биохимические факторы регуляции, которые мы называем гормонами-медиаторами, занимают особое место в интеграции процессов и функций в организме. Катехоламины проявляют свое действие во всех или почти во всех сегментах как нейро-эндокринной, так и нейро-медиаторной регуляции.

Возникает вопрос, чем обусловлена такая «универсальность» функций КА в регуляторных процессах? Почему они используются на обоих «плечах» (гормональном и медиаторном) нервной системы? Очевидно, КА должны иметь в своей структуре или обмене нечто свойственное и медиатору и гормону.

КА представлены группой близких друг к другу соединений: адреналин (А), норадреналин (НА), дофамин (ДА). Эти веще-



ства сочетают строение и свойства аминов, которые, нужно думать, были первичными раздражителями и регуляторами (протогормонами) «живого вещества» в период преобладания анаэробных форм обмена, и черты катехинов-хинонов, которые, возможно, служили первичными окислительно-восстановительными катализаторами, переносчиками электронов. КА обладают сопряженной системой двойных связей, способностью к образованию и хинонов и семихинонов, N- и O-метилированных производных, наличием делокализованных электронов кольца и уединенной пары электронов концевой азота амина (или метиламина). Они могут подвергаться различным превращениям, окисляться по «аминооксидазному» и «хиноидному» пути, подвергаться O-метилированию, связываться с различными белками и другими соединениями и т. д. (5—17).

Как указано выше, КА осуществляют медиаторную и гормональную функции (А действует преимущественно как гормон, НА как медиатор, ДА как нейрогормон в ЦНС). Почему А стал фактором гормональной, а НА медиаторной передачи? Медиаторы, действующие локально, должны, казалось бы, отличаться невысокой стабильностью, меньшей чем гормоны, которым приходится преодолевать значительно большие расстояния до места действия. Это свойство отчетливо выражено у «классического» медиатора — АХ. С КА дело обстоит несколько иначе. Вещество, осуществляющее медиаторную функцию — НА, в отношении многих воздействий несколько не лабильнее, чем биохимический фактор гормонального звена — А. В ряде работ, проведенных в нашей лаборатории, В. О. Осинская показала, что по хиноидному пути легче происходит окисление А, чем НА. Ею было показано, что в тканях животного организма содержится НА и вещества со свойствами продуктов хиноидного окисления А, получившие название «продукты окисления» (ПО). В последнее время В. О. Осинской получены прямые доказательства наличия хиноидного пути обмена КА в животном организме, найдены соответствующие продукты в моче, показано, что их образование не является артефактом, прослежена их экскреция и выявлено, что интенсивность хиноидного пути окисления КА (очевидно, характерного преимущественно для А) изменяется при различных функциональных состояниях организма (18).

Исследования, проведенные в нашей лаборатории П. А. Калиманом (19, 20), показали, что митохондриальная МАО активно дезаминирует тирамин, несколько слабее, но достаточно хорошо НА и почти совершенно не окисляет А. Фактически А — это МАО — резистентная структура и окисление его идет в митохондриях в основном по хиноидному пути. В присутствии митохондрий мозга, сердца, печени, почек происходит поглощение  $O_2$ , если субстратом служит А, но не образуется или почти не образуется метиламин. В то же время наблюдается появление

флюоресцирующих веществ типа адренолутина, характерных для хиноидного обмена КА. Если субстратом для митохондриальных ферментов служит НА, поглощение  $O_2$  и образование аммиака происходит в эквимолекулярных (или близких к ним) количествах, что указывает на превращение НА по аминоксидазному пути, то есть по пути, катализируемому МАО.

Таким образом, в отношении хиноидного окисления более устойчив медиатор, в отношении действия МАО более устойчив гормон. Можно было предположить, что именно это отношение к МАО играет некоторую роль в большей пригодности НА для медиаторной функции. Однако не следует забывать, что МАО локализована не там, где проявляется медиаторное действие НА и уже в этом существенное различие между такими субстрато-энзиматическими системами как НА — МАО и АХ — ХЭ. В этом отношении заслуживают внимания представления некоторых авторов, приписывающих МАО роль фактора, контролирующего уровень тирамина, способного вытеснить НА из «мест запасаения», а также поддерживающего на определенном уровне концентрацию самого внутриклеточного НА (21, 22).

Каковы же функциональные и другие возможные взаимоотношения между факторами медиаторного и гормонального звеньев нервной системы, между НА и А? Нужно отметить, что в последнее время несколько забывают А, уделяя все внимание биохимии НА и ДА. Так, например, обстоит дело на Международном симпозиуме по катехоламинам в Милане в 1965 г. Между тем А представляет особый интерес не только как «аварийный» гормон и вообще не только как гормон, но и как фактор, имеющий несомненные и очень сложные отношения с медиаторной функцией нервной системы. В свое время нами, на основании ряда исследований, было высказано предположение, что в образовании и функции симпатинов принимают участие продукты окисления А и что адренэргические медиаторы — это комплекс КА (НА) и продуктов хиноидного обмена А. В настоящее время возникает необходимость в некотором видоизменении этих гипотетических представлений. Несомненно, что «настоящим» медиатором в группе КА является НА. Мы ставим вопрос о том, в какой мере обмен гормона — А связан с образованием и функцией медиатора — НА. Одним из возможных путей и механизмов такого взаимодействия является следующий. Один из этапов образования медиатора, заключительный процесс его «созревания» — превращение дофамина в НА — катализируется  $\beta$ -дофамингидроксилазой, которая, по некоторым данным, нуждается в присутствии системы доноров-акцепторов электронов типа системы хинонов-катехинов, то есть веществ, образующихся при хиноидном окислении А. Таким образом, путь, по которому идет превращение гормона, может быть не безразличным для образования медиатора и его функции.



Вопрос идет не о непосредственном образовании медиатора из гормона, как в свое время предполагали на основании своих опытов А. В. Кибяков и другие, а о возможности сопряженной реакции между окислительно-восстановительными системами, возникающими в процессах обмена А и функцией фермента, катализирующего образование НА. В этом случае разрушение гормона было бы условием рождения медиатора.

Однако необходимо учитывать, что в тканях животного организма содержится много различных хинонов, в том числе таких как убинон, витамин К и другие и по сравнению с ними количество хиноидных продуктов окисления А очень незначительно. Правда, в биологических системах количество далеко не всегда играет решающую роль и, возможно, что именно адренохиноны специфичны для рассматриваемых нами процессов. В этом направлении мы проводим в настоящее время исследования.

Можно считать, что НА действует преимущественно своей нативной структурой, в то время как А появляется в тканях в нативном состоянии только в определенных условиях, при состоянии «напряжения», а обычно функционирует преимущественно в виде промежуточных продуктов его обмена, причем большое значение имеет путь этого обмена, «соскальзывание» обмена гормона (и медиатора) с одного пути обмена на другой и т. д.

Возможны различные формы функционального взаимоотношения гормональных и медиаторных факторов нервной системы. В пределах взаимодействия адренэргических гормонов — медиаторов мы имеем предварительные данные о возможном влиянии хинонов на митохондриальную МАО. В более широком плане взаимодействия различных факторов, участвующих в осуществлении гормональных и медиаторных функций, следует указать на полученные в нашей лаборатории М. П. Барц данные о влиянии кортикостероидов на «протеидизацию» НА, связанную с передачей симпатического нервного импульса. Аналогичные данные получены Э. П. Верещаковой и другими в отношении действия на «протеидизацию» медиатора АКТГ. В нашей лаборатории показано также влияние кортикостероидов и АКТГ на МАО и возможность взаимодействия гормонов и медиатора путем влияния на фермент, участвующий в обмене медиатора (А. С. Ручкина).

Мы рассмотрели некоторые вопросы взаимосвязи биохимических факторов в нейро-эндокринной системе и места КА (НА и А) среди этих факторов. Функции этих гормонов-медиаторов обусловлены, на наш взгляд, не только особенностями их нативной структуры, но также разветвленностью и многоступенчатостью их обмена и возможностью превращения отдельных их представителей по различным путям.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Sharrer E., Pfluger's Arch. ges. Physiol., 255, 254, 1952.
2. Ingle D. I., Pediatrics, 17, 407, 1956.
3. Барц М. П., Труды Укр. ин-та эксп. эндокринол., 18, 210, 1961.
4. Утевский А. М., Барц М. П., Сб.: Гипофиз-кора-надпочечников, Изд. АН УССР, Киев, 51, 1964.
5. Утевский А. М., Успехи биол. химии, 1, 423, 1950.
6. Утевский А. М., Сб.: Адреналин и норадреналин. Изд. АН СССР, М., 8, 1964.
7. Bacq Z. M., J. Pharmacol. exp. Therap., 95, 1, 1949.
8. Blaschko H., Pharmacol. Rev., 4, 415, 1952.
9. Euler U. S., Noradrenaline', Philadelphia, 1956.
10. Axelrod J., Physiol. Rev., 39, 751, 1959.
11. Утевский А. М., Ювілейний збірник АН УССР, 485, 1944.
12. Утевский А. М., Проблемы эндокринол. и гормонотерап., 1, 19, 1955.
13. Утевский А. М., Осинская В. О., Калиман П. А., Сб.: Пробл. эвол. функции и энзимохимии процессов возбуждения. Изд. АН СССР, М., 359, 1961.
14. Осинская В. О., Биохимия, 18, 56, 1953; 22, 537, 1957.
15. Осинская В. О., Сб.: Адреналин и норадреналин. Изд. АН СССР, М., 118, 1964.
16. Калиман П. А., Биохимия, 26, 284, 1961.
17. Утевский А. М., Осинская В. О., Калиман П. А., Укр. біохім. ж., 37, 5, 798, 1965.
18. Осинская В. О., Сб.: Физиология и патология эндокринной системы, 357, Харьков, 1965.
19. Калиман П. А., Биохимия, 30, 1194, 1965.
20. Калиман П. А., Автореф. докт. дисс. «Роль моноаминоксидазы митохондрий в превращении пирокатехинаминов и других биогенных аминов в тканях животного организма», Харьков, 1966.
21. Kopin I. J., Pharmacol. Rev., 16, 179, 1964.
22. Costa E., Brodie B. B., Progress in Brain Research, 8, 168, 1964.

## О НЕКОТОРЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ МЕЖДУ АЦЕТИЛХОЛИНОМ И ДРУГИМИ НИЗКО- МОЛЕКУЛЯРНЫМИ БИОАКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

Н. Н. Дёмин

Лаборатория функциональной нейрхимии Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Несомненно, что одной из самых важных задач, стоящих перед биохимией в настоящее время, является изучение механизмов регуляции направления и интенсивности процессов метаболизма. В связи с этим большое внимание привлекает роль, которую при этом играют те низкомолекулярные вещества, которые находятся в тканях иногда в крайне малых суммарных концентрациях, но способны проявлять очень высокую биологическую активность. К таким веществам относятся и так называемые медиаторы нервной активности: ацетилхолин (АХ), норадреналин (НА), серотонин, вероятно  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК) и другие.

В отношении серотонина, ГАМК, НА так же, как и родственного последнему адреналина (А), теперь уже известны многие их биохимические эффекты. Значительно меньше сведений имеется в отношении АХ.

Проблема биохимической активности АХ заинтересовала нас еще около 20 лет назад (1). Казалось, что этот медиатор, обладая определенными функциональными химическими группами и уникальными физико-химическими особенностями всей его молекулы в целом, должен принимать участие не только в экстрацеллюлярных пусковых процессах синаптической передачи активности холинергических нервных элементов, но и воздействовать на интрацеллюлярный метаболизм в тех клетках, в которых он образуется, осуществляя немедиаторные функции. Биохимические свойства АХ должны определять и его «пусковую» роль в холинергических синапсах, а также возможное участие в трофических эффектах холинергических нервных структур.

Интрацеллюлярная метаболическая немедиаторная функция

АХ и других «медиаторов», очевидно, является единственной в неиннервированных живых объектах, например, в плаценте, эритроцитах, неиннервированных эмбриональных тканях.

Действительно, в работах других исследователей и нами (см. обзоры 2—6) был обнаружен ряд возможных направлений воздействия АХ на метаболизм в различных тканях, включая и нервную.

Кроме биохимических данных, характеризующих немедиаторные влияния АХ, в настоящее время известен уже ряд фактов, указывающих и на физиологическую немедиаторную активность АХ (см., например, 7). О немедиаторном значении АХ в некоторых отделах нервной системы свидетельствуют также недавние наблюдения Вержбинской и ее сотрудников (8—11). Обширный материал, убедительно доказывающий большое значение АХ и других «медиаторов» для нормального хода развития на ранних донервных стадиях эмбриогенеза, был представлен Бузниковым (12).

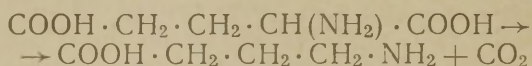
Внутри клеток АХ образуется в бесструктурной части цитоплазмы, накапливаясь в нейронах и в синаптических пузырьках. Холинэстеразная же активность сосредоточена внутри клеток в различных мембранных образованиях, переходящих при гомогенизации в микросомальную фракцию. В клетках практически весь АХ так или иначе связан с различными их компонентами. Эти обстоятельства создают предпосылки как для весьма неравномерного интрацеллюлярного распределения АХ с возможным локальным относительно большим его накоплением, существенно превышающим усредненную концентрацию АХ, так и его длительного существования после образования, благодаря пространственному разобщению участков синтеза и связывания АХ с местами фиксирования холинэстераз. Связанный АХ, не атакуемый холинэстеразами, в то же время не должен быть лишь пассивным запасом. Именно связанный АХ только и может оказывать тот или иной метаболический эффект, соединяясь более или менее длительно и более или менее прочно с субстратами своей активности и меняя, благодаря самому этому соединению, их свойства: с различными мембранами, ферментными частицами, другими белками, возможно с нуклеиновыми кислотами, ганглиозидами и т. п. К сожалению, принципиально важный вопрос конкретных путей связывания АХ и свойств образующихся при этом комплексов еще почти совершенно не изучен.

В последнее время мы также продолжали развивать исследования биохимической активности АХ, касаясь при этом и роли других низкомолекулярных биоактивных веществ, особенно в нервной ткани. В конечном счете именно биохимические эффекты АХ и должны быть молекулярной основой всех сторон его биологической активности.

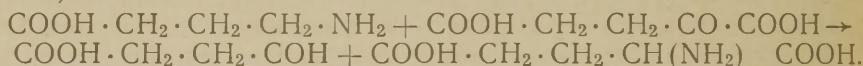


Остановимся на некоторых данных, установленных в нашей лаборатории.

Одним из существенных вопросов, имеющих близкое отношение к проблеме регуляции биохимических процессов в клетках, является взаимовлияние их низкомолекулярных биоактивных веществ на метаболизм друг друга. В этом направлении привлекают внимание наблюдения Ниловой, касающиеся действия АХ и  $\text{NH}_4^+$  на метаболизм ГАМК (13, 14). Было изучено влияние добавления хлорида АХ в конечной концентрации  $0,6 \cdot 10^{-4}$  М ( $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл) или  $1 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  *in vitro* к гомогенатам ткани больших полушарий головного мозга крысы на активность фермента, образующего ГАМК — глутаматдекарбоксилазы (L-глутамат-1-карбокси-лиазы; 4.1.1.15, ГДК):



и на активность фермента, разрушающего ГАМК — ГАМК-аминотрансферазы (4-аминобутират: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы):



Детали использованных методик описаны в других местах (13, 14). Для предотвращения ферментативного распада АХ при последующем прибавлении к пробам хлорида АХ гомогенат ткани готовили с ингибитором холинэстераз-эзерпином в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  г/мл. Концентрация АХ, равная  $0,6 \cdot 10^{-4}$  М, была избрана потому, что его биохимическая активность в опытах *in vitro* наиболее четко проявляется, как правило, именно в близких концентрациях (см., например, 5).

Полученные при этом результаты приведены на рис. 1 (I и II). Они показывают, что АХ, не влияя на образование в нерв-

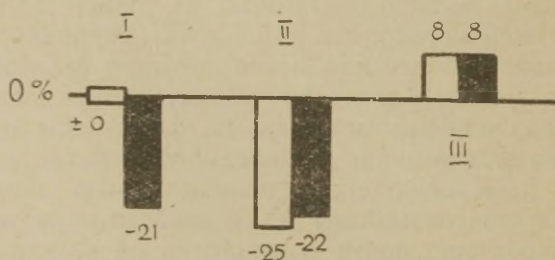
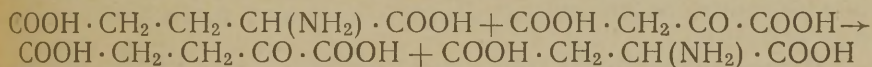


Рис. 1. Влияние  $0,6 \cdot 10^{-4}$  М ацетилхолина *in vitro* (белые столбики) и  $1 \cdot 10^{-4}$  М  $\text{NH}_4^+$  (черные столбики) на активность глутаматдекарбоксилазы (I), ГАМК-аминотрансферазы (II) и аспартатаминотрансферазы (III) головного мозга в % от контроля (по данным Ниловой, 13—15).

ной ткани другого ее низкомолекулярного биоактивного агента — ГАМК за счет ГДК активности, тормозил распад этого, в известной мере, своего функционального антагониста за счет снижения активности ГАМК-аминотрансферазы. Другой же биологический агент, возбуждающий нервную ткань, аммиак, в близкой концентрации вызывал несколько иной эффект. Аммиак так же, как и АХ, в равной степени тормозил ГАМК-аминотрансферазу, но он угнетал и ГДК.

Следовательно, и АХ, и  $\text{NH}_4^+$  — возбуждающие факторы — обладают способностью снижать распад тормозящего фактора, ГАМК. Тем самым при их накоплении во время возбуждения нервной ткани они сами могут способствовать возвращению ее в состояние относительного покоя. В то же время АХ, по-видимому, может действовать более эффективно, чем аммиак: последний угнетает не только распад, но и образование ГАМК, тогда как АХ, угнетая распад ГАМК, не влияет на ее синтез.

Для сравнения можно привести результаты опытов Ниловой (15) по изучению влияния АХ и аммиака на активность другой аминотрансферазы нервной ткани, аспартатаминотрансферазы (L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансферазы; 2.6.1.1):



На рис. 1 (III) видно, что на активность этой аминотрансферазы АХ и  $\text{NH}_4^+$  в той же молярной концентрации влияли не так, как на ГАМК-аминотрансферазу. Вместо угнетения было отмечено, хотя и небольшое, но статистически достоверное повышение активности аспартатаминотрансферазы при добавлении как АХ, так и  $\text{NH}_4^+$ . Поэтому возможно, что тормозящее действие этих агентов в данной концентрации на ГАМК-аминотрансферазу относительно специфично.

Значительно ранее нами (16) было обнаружено активирующее влияние АХ на гистидиндекарбоксилазную активность как нервной ткани, так и некоторых бактерий. Эти опыты показали, следовательно, что АХ, в известных пределах, способствует синтезу такого биоактивного агента, как гистамин.

Можно заключить, что АХ может влиять на метаболизм ряда других низкомолекулярных биоактивных веществ, соответственно изменяя интенсивность их биологического действия.

Вызывает интерес также сопоставление биохимических эффектов различных низкомолекулярных биоактивных веществ с различной их функциональной активностью *in vivo*. На основе опытов, произведенных в нашей лаборатории, можно провести подобное сравнение эффектов, вызываемых АХ и А.

Ранее Нечаевой (5, 6, 17) было установлено (рис. 2), что АХ *in vitro* в концентрациях  $0,6 \cdot 10^{-4}$ — $0,6 \cdot 10^{-3}$  М специфически подавлял активность кислой рибонуклеазы относительно чистой



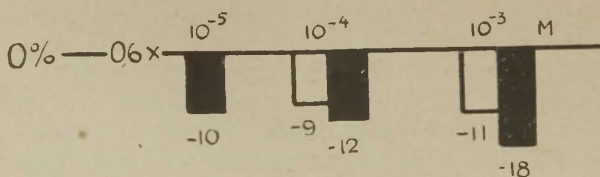


Рис. 2. Влияние ацетилхолина *in vitro* на активность кислой рибонуклеазы митохондрий клеток головного мозга: свободной (белые столбики) и суммарной после освобождения латентной (черные столбики), в % от контроля; сверху — концентрация ацетилхолина (по данным Нечаевой, 6, 17).

фракции митохондрий клеток коры больших полушарий головного мозга крыс, не влияя как на нее в других субцеллюлярных фракциях, так и на щелочную рибонуклеазу. Еще сильнее и еще в меньшей концентрации ( $0,6 \cdot 10^{-5}$  М) АХ оказывал свое тормозящее действие на суммарную активность митохондриальной кислой рибонуклеазы после освобождения ее латентной формы обработкой 4 М мочевиной. Детали методики были описаны ранее (18, 19).

В свое время Чжан Цзинь (20) показала, что АХ ( $1 \cdot 10^{-2}$  М) обладает способностью специфически тормозить и обновляемость фосфатной группы в РНК, выделенной из головного мозга. Обновляемость же  $PO_4$ -группы в фосфолипидах в той же концентрации (20, ср. 21) и в фосфопротеидах (20) он активирует.

Поэтому допустимо, что АХ может снижать метаболизм митохондриальной РНК.

В других же опытах Нечаевой (22) с введением крысам и кошкам А был получен противоположный эффект. Крысам (180—200 г весом) А вводили подкожно по 30 мкг на животное ежедневно в течение 14 дней; кошкам (2,5—3,0 кг весом) А вводили так же, в дозе 60 мкг на животное.

Как видно из рис. 3 (1), инъекции А приводили к резкому повышению активности кислой рибонуклеазы в митохондриях нервной ткани кошек. В то же время суммарная активность кислой рибонуклеазы после освобождения и ее латентной формы изменялась меньше, чем активность свободной. Напомним, что при тормозящем влиянии АХ были обнаружены другие отношения (рис. 2). Обращает на себя внимание определенная видовая разница в данных условиях: активность кислой рибонуклеазы у крыс, которым вводили А, также изменялась, но значительно меньше, чем у кошек (рис. 3, II).

Ранее, после 3-часового раздражения преганглионарного ствола верхнего шейного симпатического ганглия кошки электрическим током супрамаксимальной силы с частотой 300 имп./сек



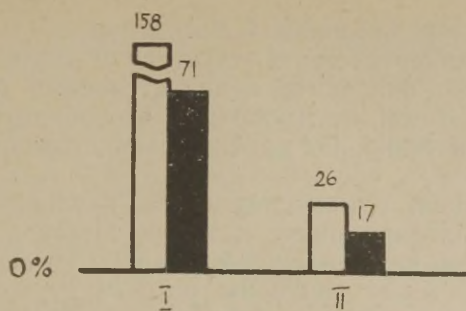


Рис. 3. Влияние хронического введения адреналина на активность кислой рибонуклеазы митохондрий клеток головного мозга: свободной (белые столбики) и суммарной после освобождения латентной (черные столбики) у кошек (I) и у крыс (II), в % от контроля (по данным Нечаевой, 22).

Певзнер (23—25) двухволновым цитоспектрофотометрическим методом установил, что такое воздействие приводит к значительному изменению величины экстинкции, характерной для нуклеиновых кислот, в нейронах и в глиальных клетках-сателлитах. Было показано (рис. 4, А), что тогда, как в нейронах величина специфической экстинкции, а, следовательно, и содержание РНК, значительно повышается, в глиальных клетках она снижается. Одновременно микроинтерферометрическим методом было найдено и накопление белка в нейронах.

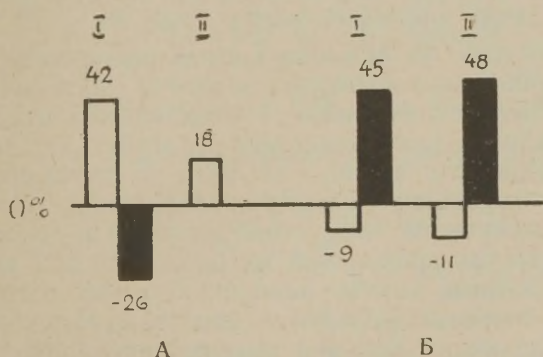


Рис. 4. Влияние длительного раздражения верхнего шейного симпатического ганглия кошек (А) и хронического введения адреналина кошкам (Б) на содержание РНК (I) и белка (II) в нейронах (белые столбики) и в глиальных клетках-сателлитах (черные столбики) в % от контроля (по данным Певзнера, 23—27).

Поскольку верхний шейный симпатический ганглий представляет собой холинергическую структуру и длительное раздражение его должно приводить к значительному повышению концентрации АХ в нем, не исключено, что обнаруженный Певзнером эффект частично, по крайней мере, связан и с действием АХ.

В дальнейшем, при исследовании верхнего шейного симпатического ганглия кошек, которым Певзнер так же, как и Нечаева (см. выше), вводил А (по 60 мкг ежедневно в течение 14 дней), были получены результаты, противоположные установленным в опытах с раздражением ганглия (26, 27). Как видно из рис. 4 (Б), инъекции А не влияли статистически достоверно на содержание РНК и белка в нейронах, весьма существенно увеличивая содержание этих компонентов в глиальных клетках-сателлитах.

Таким образом, и в этих опытах, по-видимому, проявилась противоположная направленность биохимической активности АХ и А.

Согласно теперь уже многим литературным данным (см., например, 28, 29), А обладает способностью повышать липолитическую активность различных тканей. Изучение влияния АХ на липолитическую активность гомогенатов больших полушарий головного мозга крысы было проведено Рубинской (5, 30). Вначале ею было выяснено, что нервная ткань может ферментативно гидролизовать триглицериды и что оптимальным для этого процесса является рН 7,4. В опытах же с добавлением АХ *in vitro* при оптимальной концентрации его  $0,6 \cdot 10^{-3}$  М оказалось, что он в очень небольших пределах, но сразу после его прибавления статистически достоверно тормозил слабую липолитическую активность ткани головного мозга (рис. 5).

Следовательно, на примере кислой рибонуклеазы митохондрий ткани головного мозга, возможно в отношении метаболизма РНК и белка в нейронах и глиальных клетках-сателлитах верхнего шейного симпатического ганглия, а также липолитической активности видно, что АХ и А проявляют тенденцию к действию в противоположных направлениях. Не исключается, что эти биохимические феномены входят и в основу некоторых антагонистических проявлений их биологической активности.

Все изложенные данные расширяют и конкретизируют представления о сложных функциональных взаимосвязях регулирующих, модулирующих влияний низкомолекулярных биоактивных веществ на метаболизм, в частности и в нервной ткани. При анализе механизмов изменений функционального состояния различных участков нервной системы следует учитывать, что все эти изменения связаны и со сдвигами в содержании и распределении в этих участках биоактивных агентов, следовательно, и с колебаниями в их эффектах на биохимические процессы.

мл 0,05 н. NaOH

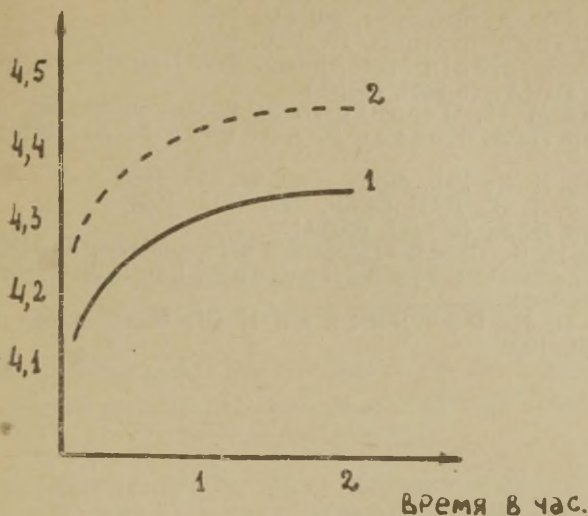


Рис. 5. Влияние ацетилхолина *in vitro* на липолитическую активность ткани головного мозга.  
1 —  $0,6 \cdot 10^{-3}$  М ацетилхолин, 2 — контроль (по данным Рубинской, 5, 30).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., ДАН СССР, **62**, 145, 1948.
2. Демин Н. Н., Биохимическая активность ацетилхолина, докт. дисс., М., 1952.
3. Райскина М. Е., Биохимия нервной регуляции сердца, М., 1962.
4. Демин Н. Н., В кн.: Проблемы эволюции функций и энзимохимии процессов возбуждения, М., 118, 1968.
5. Демин Н. Н., В кн.: Проблемы нейрохимии, М.—Л., 197, 1966.
6. Демин Н. Н., В кн.: Биохимия и функция нервной системы, Л., 244, 1967.
7. Берн Г., Функции химических передатчиков вегетативной нервной системы, М., 1961.
8. Вержбинская Н. А., В кн.: Эволюция функций, Л., 219, 1964.
9. Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., В кн.: Функциональная эволюция нервной системы, М.—Л., 41, 1965.
10. Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., В кн.: Проблемы нейрохимии, М.—Л., 181, 1966.
11. Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., Тонкоглас В. П., (в наст. сборн., стр. 553).
12. Бузников Г. А., Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития, М., 1967.
13. Нилова Н. С., ДАН СССР, **166**, 483, 1966.
14. Демин Н. Н., Нилова Н. С., Вопр. биохимии мозга, III, Ереван, 45, 1967.
15. Нилова Н. С., Вопр. мед. химии, **12**, 514, 1966.
16. Демин Н. Н., Тр. Ин-та морфологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР, **6**, 115, 1952.



17. Демин Н. Н., Нечаева Г. А., ДАН СССР, 166, 1458, 1966.
18. Нечаева Г. А., Укр. біохім. ж., 86, 607, 1964.
19. Нечаева Г. А., Биохимия, 30, 644, 1965.
20. Чжан Цзинь, Биохимия, 25, 1099, 1960.
21. Hokin L. E., Hokin M. R., Intern. Rev. Neurobiol., 2, 99, 1960.
22. Нечаева Г. А., (в наст. сборн.).
23. Баранов М. Н., Певзнер Л. З., Биохимия, 28, 958, 1963.
24. Певзнер Л. З., Коваль В. А., Кучин А. А., Цитология, 6, 216, 1964.
25. Певзнер Л. З., Укр. біохім. ж., 38, 123, 1966.
26. Певзнер Л. З., ДАН СССР, 156, 1213, 1964.
27. Певзнер Л. З., (в наст. сборн.).
28. Давтян Н. К., Пробл. эндокринол. и гормонотер., 9, 6, 33, 1963.
29. Rubinstein D., Chiu S., Naylor J., Beck J. C., Am. J. Physiol., 206, 149, 1964.
30. Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Бюлл. exper. биол. и мед., 62, 9, 51, 1966.

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ БИОХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ СИСТЕМЫ АЦЕТИЛХОЛИНА МОЗГА В РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н. А. Вержбинская, Н. Л. Лейбсон, В. П. Тонкоглас

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
АН СССР, Ленинград

При изучении биохимических характеристик системы ацетилхолина (АХ) мозга в ряду позвоночных животных, от круглоротых до млекопитающих, обнаружились факты, трудно совместимые с представлением о том, что медиаторная синаптическая функция является единственной функцией системы АХ в мозгу на всех уровнях эволюции позвоночных животных.

Система АХ в нервной ткани с самых ранних этапов эволюции позвоночных (круглоротые) содержит все компоненты, обнаруживаемые в ЦНС высших животных: медиатор АХ, содержащийся в ткани мозга низших животных преимущественно в связанной форме; систему, синтезирующую АХ, синтез которого проходит через этап образования макроэргического ацетил-КоА, с последующим переносом активного ацетата на холин при посредстве собственно холинацетилазы (ХА), или холинацетилтрансферазы; и гидролизующий фермент ацетилхолинэстеразу (АХЭ, ацетилгидролаза АХ, МКФ, 3.1.1.7; 1—5).

Однако, сравнительно-биохимическое изучение системы АХ мозга в ряду позвоночных животных показало, что наряду с химической однородностью можно обнаружить и характерные особенности функциональной организации системы на разных этапах эволюции позвоночных и в отдельных структурах мозга у разных видов.

В эволюции изменяются ферментные активности в системе, причем изменение активностей ХА и АХЭ имеет различную направленность у водных и наземных позвоночных. Это имеет своим следствием изменение соотношения активности АХЭ/ХА. Изменяется субстратная специфичность нейронной АХЭ, ее локализация (4, 5). Сопоставление экспериментальных фактов, полученных при подробном обследовании многих видов из каж-

дого класса позвоночных животных, неизбежно приводит к мысли о том, что в эволюции произошло изменение функции системы АХ мозга, что специализированная синаптическая функция системы АХ, доминирующая в мозгу высших животных, видимо дифференцировалась из более древней и более примитивно организованной «регуляторной» функции, которая у низших позвоночных связана, по-видимому, со всей, еще неполностью дифференцированной, мембраной нейронов. Далее выяснилось, что и в ЦНС высших наземных позвоночных — млекопитающих — встречаются структуры, в которых функция системы АХ тоже, по-видимому, связана со всей мембраной нейронов, не ограничена только синаптической областью мембраны. В этих структурах система АХ, видимо, тоже выполняет регуляторную функцию.

Таким образом сравнительно-биохимическое исследование системы АХ мозга в ряду позвоночных животных показало, что на основе одинакового химического строения системы АХ у всех представителей позвоночных в эволюции осуществляется прогрессивная дифференцировка этой ферментной системы, происходит ее перестройка. Дифференцировка системы АХ включает ее биохимическую перестройку, происходящую наряду со структурными изменениями в нервной ткани — дифференцировкой мембран, формированием синаптического аппарата, специализацией глиальной системы, развитием миелиновых оболочек. Химические и структурные изменения приводят к изменениям функциональным — в холинэргических структурах мозга развивается специализированная, эффективная синаптическая функция системы АХ. Все ряды изменений — химических, морфологических и функциональных — представляют собою элементы единого процесса функциональной дифференцировки ЦНС позвоночных животных.

В настоящем сообщении излагаются факты, иллюстрирующие гетерогенность системы АХ в мозгу высших животных.

### Методика

Система АХ в нервной ткани позвоночных животных характеризовалась по нескольким признакам.

Определялась активность системы, синтезирующей АХ, для чего на срезах мозга из различных мозговых структур в инкубационной среде, обогащенной коферментами и субстратами, определялась скорость протекания всей цепи реакций, приводящих к синтезу АХ. Мы не пользовались предварительной инкубацией срезов для накопления ацетил-КоА и не употребляли ацетоновых порошков мозга, как это делает Хебб (6) и, таким образом, измеряли не собственно активность ХА, а скорость протекания всей цепи реакций синтеза АХ, в которой ХА не является лимитирующим звеном. Срезы мозга инкубировали в солевой смеси Кребса, III (7), не содержащей глюкозы и органических кислот; в 0,5 мл этой смеси содержалось: 1 мг прозерина, 14 мкмоль  $\text{NaF}$ , 14 мкмоль  $\text{Na-ATФ}$ , 40 мкг КоА, по 8—30 мкмоль холинхлорида и Na-ацетата. Конечный объем



пробы варьировал от 0,5 до 0,7 мл, рН 7,4; навеска ткани — 100—150 мг, инкубация от 15 до 60 минут в зависимости от активности синтезирующей системы. Температура инкубации — 20°—25° С для холоднокровных животных (мозг рептилий инкубировали при 30° С) и 38°—40° С для теплокровных. По окончании инкубации сосудики охлаждали и центрифугировали при рН 6,0. В супернатанте содержался свободный АХ. Из осадков экстрагировали связанный АХ по Стоуну (8). Осадки растирали с несколькими каплями 4% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) при рН 2,0, нагревали в течение 1 минуты до 100° С и на 2 часа оставляли при комнатной температуре, затем избавлялись от избытка ТХУ двукратным встряхиванием проб с равным объемом эфира, который удаляли продуванием воздухом. В отдельных опытах ТХУ заменяли 1 и НСl и продувание эфиром исключалось (8, 4). Пробы мозга, содержащие свободный и связанный АХ хранились в холодильнике при рН 4—6, активность их не изменялась в течение недели. Содержание АХ в мозговых экстрактах определяли биологическим методом, по высоте 1-минутной контрактуры прозеринизированной прямой мышцы живота лягушки (4).

Нейронную АХЭ и вненейронную неспецифическую ХЭ (ацилгидролаза ацилхолинов, МКФ, 3.1.1.8) исследовали количественно методом потенциометрического титрования или манометрическим методом, в 10—15 мг нервной ткани. Тканевую локализацию холинэстераз исследовали гистохимическим тиохолиновым методом Кёлле, в модификации Жеребцова (9, 10).

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена сводка количественных данных по активности ферментов системы АХ мозга в ряду позвоночных животных. Сплошной линией на правой половине рисунка показана интенсивность синтеза АХ в срезах среднего мозга позвоночных, в принятых нами условиях опыта. У всех водных холоднокровных позвоночных (круглоротых и рыб) синтез АХ протекает с очень низкой скоростью: 4—8 мкг АХ синтезирует 1 г влажного веса среднего мозга за 1 час. Уже у амфибий (лягушка) срезы спинного мозга способны синтезировать 10—12 мкг АХ/1 г влажного веса мозга/1 час. В классе рептилий наблюдается значительное увеличение скорости синтеза АХ; у черепах максимальная скорость синтеза достигала 24 мкг АХ/1 г/1 ч., а у варана в отдельных опытах синтез АХ в передних отделах стволовой части мозга достигал 60—70 мкг АХ/1 г/1 час. Резко интенсифицируется синтез АХ в мозгу птиц. У мелких птиц (исследовано 15 видов отряда воробьиных, пойманных сетью во время миграционного пролета на Куршской косе) синтез АХ в стволовой части мозга очень высок, отдельные виды синиц (*Parus major*, *Parus coeruleus*) синтезировали до 300 мкг АХ/1 г/1 час; передний мозг и мозжечок проявляли более низкую и приблизительно одинаковую интенсивность синтеза АХ (5). У крупных птиц: голубь, дятел, кура — синтез АХ в мозгу был значительно ниже (5). В головном мозгу млекопитающих наиболее активными отделами являются продолговатый и спинной мозг, на последнем месте стоят кора больших полушарий и кора мозжечка. В наших экспериментах срезы спин-

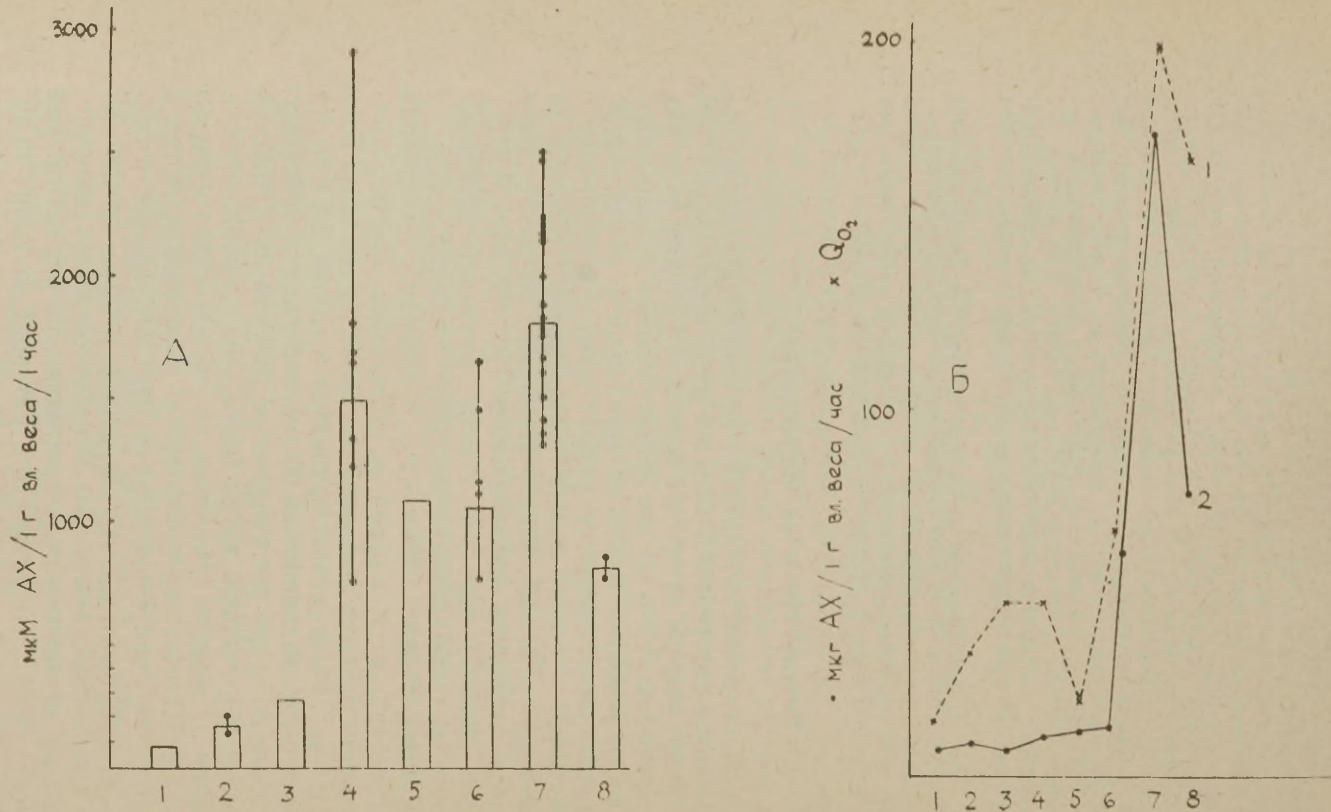


Рис. 1. Активность АХЭ и ХА в среднем мозгу позвоночных животных. Белые столбики слева — активность АХЭ в мкМ гидролизованного АХ / 1 г влажного веса мозга / 1 час; точками показаны межвидовые различия в каждом классе; высота столбика — средняя величина активности АХЭ мозга для класса в целом. Сплошная линия справа — интенсивность синтеза АХ в мкг АХ / 1 г влажного веса мозга / 1 час; прерывистая линия справа — активность цитохромоксидазы среднего мозга,  $O_2$ .  
1 — круглоротые; 2 — хрящевые рыбы; 3 — осетровые рыбы; 4 — костистые рыбы; 5 — амфибии; 6 — рептилии; 7 — птицы; 8 — млекопитающие.



ного мозга летучей мыши синтезировали до 35 мкг АХ, срезы продолговатого и спинного мозга крысы — до 70 мкг АХ, срезы мозга кролика — до 55 мкг АХ/1 г влажного веса мозга/1 час. В литературе встречаются цифры близкие к нашим у авторов, исследовавших уровень активности всей синтезирующей АХ системы (11—14), или значительно более высокие — у авторов определявших активность собственно ХА (3, 6, 15—17).

На рисунке 1 можно видеть также, что интенсивность синтеза АХ в мозгу коррелирует с уровнем окислительного обмена мозга, с развитием системы цитохрома С-цитохромоксидазы, которая в мозгу водных холоднокровных не достигает высокой специфичности, дифференцировки и мощности, свойственных цитохромной системе мозга высших животных (18—19). Фосфорилирующее дыхание в мозгу водных позвоночных значительно ниже, чем у наземных и соответственно синтез АХ не обеспечен в достаточной мере энергией и АТФ.

Совсем иной путь эволюции обнаруживается в отношении АХЭ-ной активности мозга в ряду позвоночных животных. На рис. 1 столбиками представлена средняя активность АХЭ стволовой части мозга, определенная у нескольких видов из каждого класса позвоночных. Точками показаны межвидовые различия в пределах одного класса (в тех случаях, когда они были значительными). АХЭ-ная активность мозга уже у костистых рыб достигает очень высоких значений. У отдельных видов костистых рыб, например у ставриды (*Trachurus Trachurus*), обнаружены самые высокие величины активности АХЭ мозга из всего подтипа позвоночных. У наземных позвоночных АХЭ-ная активность мозга в среднем представлена более низкими величинами по сравнению с рыбами. Она снижается в направлении от амфибий к млекопитающим. Из этого ряда выделяются мелкие птицы, имеющие очень высокую АХЭ-ную активность среднего мозга. Однако высокая АХЭ мозга птиц коррелирует с высокой интенсивностью синтеза АХ, с высокой интенсивностью энергетического обмена мозга. У рыб же высока только АХЭ, синтез АХ и энергетический обмен мозга — низки. Таким образом система АХ мозга костистых рыб и вообще водных холоднокровных отличается значительным превышением АХЭ-ной активности над интенсивностью синтеза медиатора — АХ.

У наземных позвоночных активность АХЭ соответствует интенсивности синтеза АХ и возрастает в мозгу сопряженно с усилением последнего (5). Соответствующие отношения активности АХЭ к интенсивности синтеза АХ для пяти отделов мозга позвоночных представлены на рисунках 2—4, в которых даны средние величины этого индекса для каждого класса позвоночных. В эволюции наблюдается отчетливое снижение величин индекса «активность АХЭ/интенсивность синтеза АХ»; такое же направление изменений, которое характерно для всего ряда в



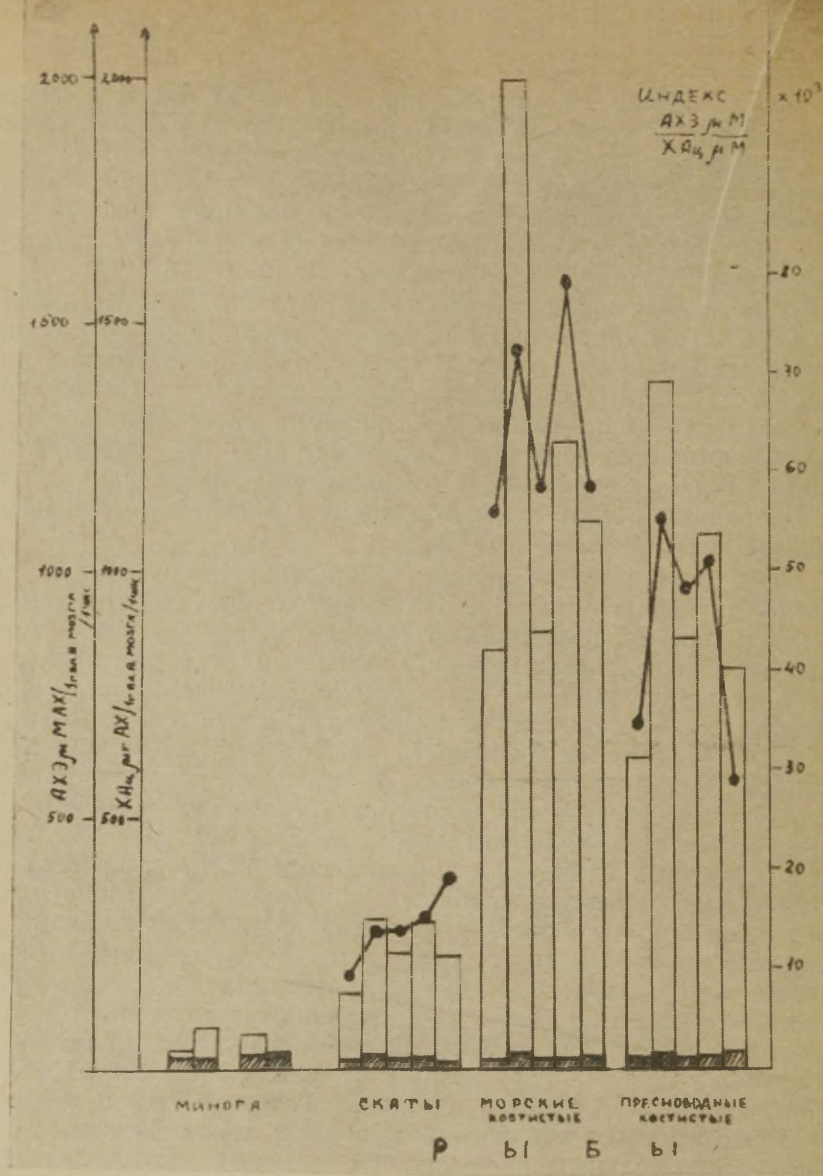


Рис. 2. Диаграмма, показывающая отношение активности АХЭ к интенсивности синтеза АХ для пяти отделов головного мозга миноги, скатов и костистых рыб. Белые столбики — активность АХЭ в мкМ АХ / 1 г влажного веса мозга / 1 ч.; зачерненная часть столбиков — интенсивность синтеза АХ мкг АХ  $\times 10^3$  / 1 г вл. веса мозга / 1 час; точки — численное значение индекса  $\frac{\text{активность АХЭ мкМ АХ}}{\text{интенсивность синтеза мкМ АХ}}$ .

В каждой группе: 1-й столбик — передний мозг  
 2-й „ — средний и промежуточный мозг  
 3-й „ — мозжечок  
 4-й „ — продолговатый мозг  
 5-й „ — спинной мозг.

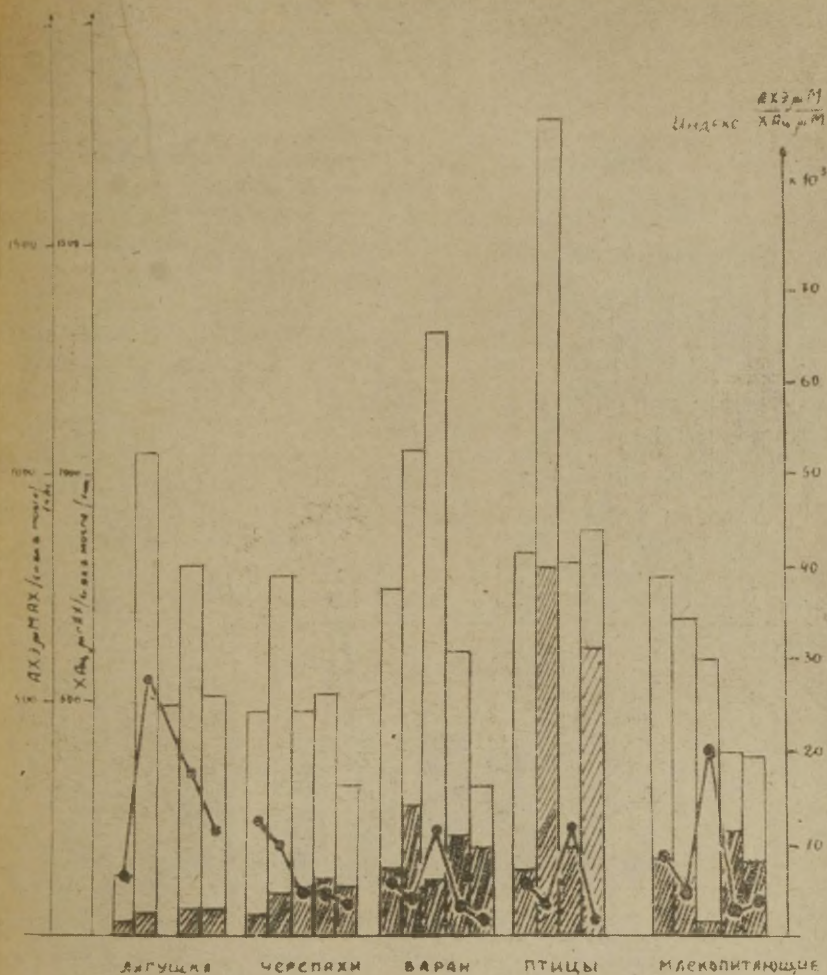


Рис. 3. Диаграмма отношений активности АХЭ к синтезу АХ для пяти отделов мозга у наземных позвоночных. Обозначения те же, что и к рис. 2.

целом, наблюдается и в пределах отдельных классов позвоночных (рис. 4). Низкие величины индекса, т. е. соответствие активности АХЭ синтезу АХ, которые характерны для типичных холинэргических структур, обнаруживаются уже в продолговатом и среднем мозгу высших рептилий и далее у птиц и млекопитающих. Эти цифры дают нам основание сказать, что только

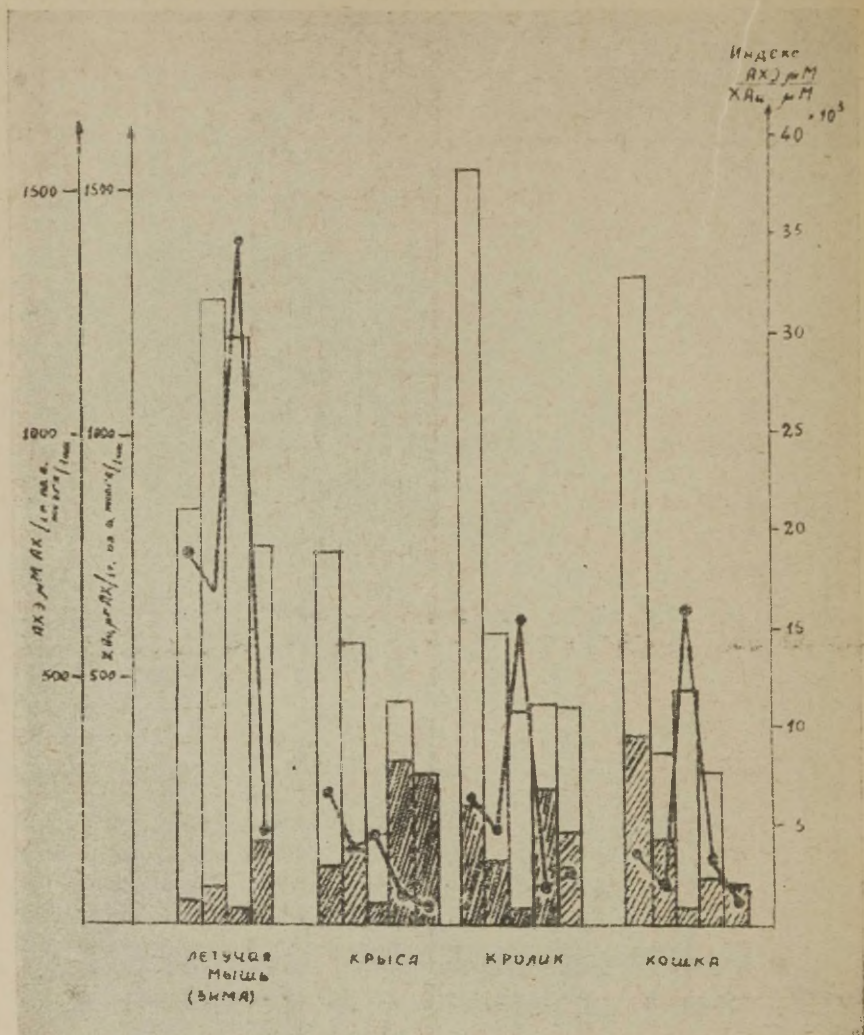


Рис. 4. Диаграмма отношений активности АХЭ к синтезу АХ для пяти отделов мозга у наземных позвоночных. Обозначения те же, что и к рис. 2.

у наземных позвоночных, начиная с рептилий, можно предполагать доминирование медиаторной синаптической функции системы АХ в ЦНС наземных позвоночных. В отношении водных холоднокровных подобное утверждение не соответствует фактам. Огромные величины индексов в мозгу костистых рыб указывают на иную структуру и, вероятно, функцию системы АХ,



доминирующим компонентом в которой является фермент АХЭ. Трудно представить себе возможность массового осуществления синаптической медиаторной функции АХ в системе, организованной по «водному» типу. Синаптическая функция в мозгу рыб, видимо, представлена в той мере, в какой она обеспечена синтезом медиатора АХ.

Гистохимические данные (20, 21) показывают, что АХЭ в мозгу рыб в главной массе не имеет специально синаптической локализации. В отличие от наземных позвоночных, у которых АХЭ локализована по периферии цитоплазмы нейронов, в области аксо-соматических синапсов, у миноги и рыб она локализована равномерно по всей цитоплазме нейронов, их аксонов и дендритов (20). В мозгу высших костистых рыб гистохимическая реакция на АХЭ обнаружена не только в цитоплазме нейронов, но и в специальных синаптических областях спинного мозга (например, в перимедулярном сплетении), однако основной является все же нейронная локализация АХЭ. В мозгу миноги и скатов нейронная АХЭ обладает низкой субстратной специфичностью к АХ — она с близкими скоростями расщепляет АХ и бутирилхолин (БХ) и дает гистохимическую реакцию на АХЭ с ацетилтиохолином (АХ) и бутирилтиохолином (БХ) в одних и тех же нейронах (5, 20, 21). АХЭ мозга костистых рыб высоко специфична к АХ (в сравнении с БХ), однако и здесь, после очень длительной инкубации, гистохимическая реакция с БХ обнаруживается в тех же структурах, в которых наблюдалась и реакция с АХ. У наземных позвоночных, в противоположность рыбам, АХЭ и неспецифическая ХЭ имеют, как правило, отдельную локализацию. По данным всех авторов, включая и наши данные, у них АХЭ связана только с нейронами (у некоторых видов еще и с сосудистым эндотелием), тогда как ХЭ локализована преимущественно вне нейронов — в белом веществе, в глиальных клетках серого вещества, в эндотелии капилляров.

Наивысшие активности АХЭ в мозгу рыб сосредоточены в среднем и продолговатом мозгу. Очень высока у многих видов рыб активность АХЭ в коре мозжечка. Эти отделы мозга у рыб представляют высшие уровни анализа и интеграции в ЦНС. Можно отметить также связь между моторной активностью вида и активностью АХЭ в ЦНС. Среди исследованных нами видов более подвижные имели, как правило, значительно более высокую активность АХЭ в мозгу по сравнению с видами малоподвижными. Таким образом, сопоставление биохимических количественных данных о распределении активности фермента и гистохимических — о его цитологической и тканевой локализации — не оставляет сомнений в том, что АХЭ мозга рыб функционирует и высокая ее активность необходима для осуществления функции ЦНС.

Однако, как уже отмечалось, особенности, характеризующие систему АХ в мозгу рыб, трудно совместимы с укоренившимся представлением о том, что синаптическая медиаторная функция системы АХ является ее единственной или резко преобладающей функцией в ЦНС всех позвоночных животных. Существеннейшим отличием системы АХ мозга рыб является огромное несоответствие активностей АХЭ и синтезирующей АХ системы. Медиатор продуцируется с низкой скоростью и скорость его синтеза монотонно одинакова во всех отделах ЦНС рыб и у всех исследованных видов, тогда как активность АХЭ распределена неравномерно по отделам мозга и наблюдаются значительные межвидовые различия. Не исключена возможность существования в мозгу рыб иного медиатора, чем АХ, функционирующего в комплексе с АХЭ. Это предположение все же мало вероятно, так как сравнение скорости гидролиза АХ и БХ гомогенатами мозга рыб показало высокое сродство АХЭ к АХ и практически полную неспособность гидролизовать БХ. Таким образом, АХЭ мозга костистых рыб высоко специфична к АХ подобно АХЭ холинэргических структур мозга наземных позвоночных.

Мы позволяем себе высказать предположительное пока толкование всей совокупности фактов, полученных при сравнительном изучении системы АХ в мозгу позвоночных животных. Нам представляется, что нейроны ЦНС водных холоднокровных еще не достигли уровня дифференцировки синаптических мембран, свойственного высшим животным. Морфологически трудно обнаружить различия в степени дифференцировки мембран. Биохимический тест в этом отношении, вероятно, является более чувствительным и точным. В мозгу рыб чрезвычайно высокая активность АХЭ, обусловленная, вероятно, ее диффузным распределением по всей цитоплазме нейронов, их аксонов и дендритов, свидетельствует и об отсутствии функциональной специализации отдельных участков мембраны нейрона. Еще не дифференцировались специальные свойства синаптической мембраны, еще не достигнут уровень специализации глиального аппарата, не завершён процесс миелинизации нервных волокон. Сосредоточение функции системы АХ в зоне мембран холинэргических синапсов в ЦНС высших животных нам представляется, в свете полученных данных, достижением прогрессивной эволюции нервной системы позвоночных животных. Синаптическая функция системы АХ в мозгу высших животных обладает чертами прогрессивной организации — эффективностью, экономичностью (активность АХЭ снижается), точной, целесообразной локализацией фермента в участках проявления активности, высокой субстратной специфичностью ферментов. Сосредоточение места функции системы АХ в области синаптических мембран отражает, видимо, процесс дифференцировки, специализации самих



мембран нейронов. Процесс этот происходит, очевидно, параллельно с дифференцировкой функции нейроглиального аппарата. Таким образом сведения, полученные при изучении соотношения ферментных активностей — АХЭ/ХА — и локализации АХЭ в разных структурах мозга у водных холоднокровных позвоночных, сопоставление этих данных с такими же для наземных животных, привели к мысли о том, что медиаторная функция системы АХ, связанная с холинэргическими синапсами мозга, занимает доминирующее положение только у наземных форм. В ЦНС водных позвоночных система АХ выполняет какую-то иную внутринейронную функцию, связанную с регуляцией проницаемости всей мембраны нейрона, а не только его синаптической мембраны. Существование немедиаторной внутриклеточной функции системы АХ обстоятельно исследовано в работе Бузникова (22), показавшего, что в эмбриогенезе беспозвоночных, в период донервной стадии развития функционирует система АХ, регулирующая процесс дробления и клеточной дифференцировки. В нервной ткани низших позвоночных внутринейронная функция системы АХ (судя по цитологической локализации АХЭ) обуславливает, по-видимому, распространение возбуждения в пределах нейрона. Эта функция оказывается осуществимой при сочетании низкой скорости синтеза АХ с высокой активностью АХЭ.

Нам представляется, что описанные факты примиряют две существующие точки зрения на функцию системы АХ в нервной ткани позвоночных животных — точку зрения Нахманзона (17), предполагающего участие системы АХ в процессе распространения импульса вдоль аксона, и точку зрения Кёлле и всех фармакологов, ограничивающих функцию системы АХ только областью холинэргических мембран синапсов (23). Видимо, судьба этих двух борющихся гипотез повторит судьбу длительного спора между Виландом и Варбургом о структуре дыхательной цепи. Развитие науки привело к признанию правоты обоих ученых. И в данном случае эволюционный материал предоставляет факты, показывающие, что в эволюции животного мира существуют различные варианты функции одних и тех же систем, в частности системы АХ в нервной ткани позвоночных животных.

В дальнейшем исследовании оказалось, что и у высших наземных позвоночных система АХ в разных структурах мозга имеет различное соотношение ферментных активностей — АХЭ/ХА, — различную локализацию АХЭ и по ряду признаков, видимо, сильно отличается от системы АХ типичных холинэргических синапсов. На рис. 2—4 представлены величины активности АХЭ и скорости синтеза АХ; точками нанесены средние величины соотношения этих активностей или индексы для пяти отделов мозга. Высокие индексы, свойственные мозгу водных позвоночных, снижаются в эволюции наземных животных.



Но дело не ограничивается общим снижением индексов в эволюции. На диаграммах можно видеть различие между отделами мозга по величине индексов. Особенно выделяется мозжечок, который у всех наземных форм, начиная с рептилий, обладает высокой АХЭ-ной активностью и крайне низкой активностью синтезирующей АХ системы, т. е. отличается высокими значениями соответствующего индекса по сравнению с другими отделами мозга, в которых велико содержание типичных холинэргических синапсов. Система АХ в мозжечке высших позвоночных в настоящее время исследуется интенсивно в разнообразных аспектах. Сочетание многих средств анализа: изучение тонкой структуры слоев коры мозжечка, типов связей между отдельными элементами, электронно-микроскопическое исследование (24—27), физиологические эксперименты, определение холинэргичности и холинорецептивности клеточных элементов коры мозжечка (28—33), изучение происхождения холинэргических волокон в коре мозжечка в опытах с подсечением ножек и отдельных участков коры (30, 31, 34—36) и, наконец, изучение тканевой и цитологической локализации АХЭ (10, 30, 31, 37—42) в сопоставлении с количественными биохимическими данными — вот те приемы, которые в последние годы принесли уже немало успеха в познании принципов организации системы АХ в мозжечке высших животных. Способствует этому также последовательное эволюционное исследование системы АХ в ряду позвоночных животных (5, 40).

В мозжечке высших животных, видимо, сочтены обе функции системы АХ: древняя — регулирующая внутриклеточная функция и новая — синаптическая медиаторная функция. В зернистом слое коры мозжечка АХЭ, вероятно, связана преимущественно с типичными холинэргическими структурами, синапсами мозжечковых гломерул, представляющими собою синаптические контакты афферентных моховидных волокон с дендритами клеток зерен (2, 3, 30, 31, 38). Однако и в зернистом слое мозжечка, возможно, не вся АХЭ связана с холинэргическими моховидными волокнами, часть ее, по-видимому, относится к структурам, выполняющим регуляторную роль, осуществляющим модулирование афферентных импульсов в месте их переключения на следующий нейрон (32). Морфологические и физиологические исследования последних лет показали, что мозжечковые гломерулы представляют сложные протоплазматические образования, получающие многочисленные возвратные коллатерали от всех клеточных элементов коры мозжечка; в них замыкаются множественные обратные связи, создаются циркулярные пути, поддерживающие длительное состояние активности, возникающее под влиянием приходящих афферентных импульсов (33, 43).

Многие авторы, исследующие холинэргические структуры мозжечка, полагают, что молекулярный слой коры вовсе не содер-

жит холинэргических синапсов. Клетки Пуркинье, дендриты которых составляют основную массу молекулярного слоя мозжечка, не считаются холинорецептивными (29, 32). Высокую активность АХЭ в молекулярном слое коры мозжечка склонны связывать с регуляторной функцией системы АХ. К сожалению, исследование точной локализации АХЭ в молекулярном слое крайне затруднено. Молекулярный слой образует сложно переплетенный, густой нейропиль, состоящий (особенно в нижней части) из дендритов клеток Пуркинье и контактирующих с ними параллельных волокон (аксонов клеток зерен). Не рассматривая здесь других элементов молекулярного слоя, отметим только, что характерным типом синаптических контактов в этой области являются перекрестные контакты, во множестве образуемые параллельными волокнами с шипиками третичных разветвлений дендритов клеток Пуркинье. Каждое параллельное волокно образует множество синапсов с дендритами по всей своей длине (25—27). Уже из этого факта — способности аксонов образовывать синапсы всей протяженностью боковых поверхностей — следует, что мембрана нейрона мало специализирована, все точки ее поверхности разнозначны. Соответственно и АХЭ локализована и функционирует на всем протяжении аксонов (38, 39). Несомненно, что мембрана этих нейронов отлична по своим свойствам от мембран типичных холинэргических нейронов.

Далее обнаружено, что в молекулярном слое мозжечка кошки и крысы начальные стволы и первичные ветви дендритов клеток Пуркинье, свободные от синаптических контактов, одеты плотным слоем глиальных клеток, полностью изолирующих их от окружающей среды, образующих своеобразный глиальный барьер. Таким образом в молекулярном слое коры мозжечка высших животных представлена своеобразная форма дифференцировки мембран нейронов; регуляция проницаемости мембраны осуществляется при участии глиального аппарата, образующего клеточный барьер по всей поверхности дендритов клеток Пуркинье, оставляя, однако, свободными пункты, где образованы синаптические контакты (25—27).

С этими особенностями структуры слоев коры мозжечка, вероятно, связана специфика в распределении гистохимической реакции на АХЭ у разных видов позвоночных животных. Ряд авторов в последние годы, исследуя локализацию АХЭ в коре мозжечка у разных видов позвоночных, обнаружили видовую изменчивость этого теста. Фриде и Флеминг (37) и другие (30, 41, 42) обнаружили различную гистохимическую локализацию АХЭ в мозжечке птиц и млекопитающих. Птицам, по их данным, свойственна сильная реакция на АХЭ в молекулярном слое коры мозжечка, млекопитающим — в зернистом. Н. Лейбсон (5, 40), обследовав большое число видов из каждого класса



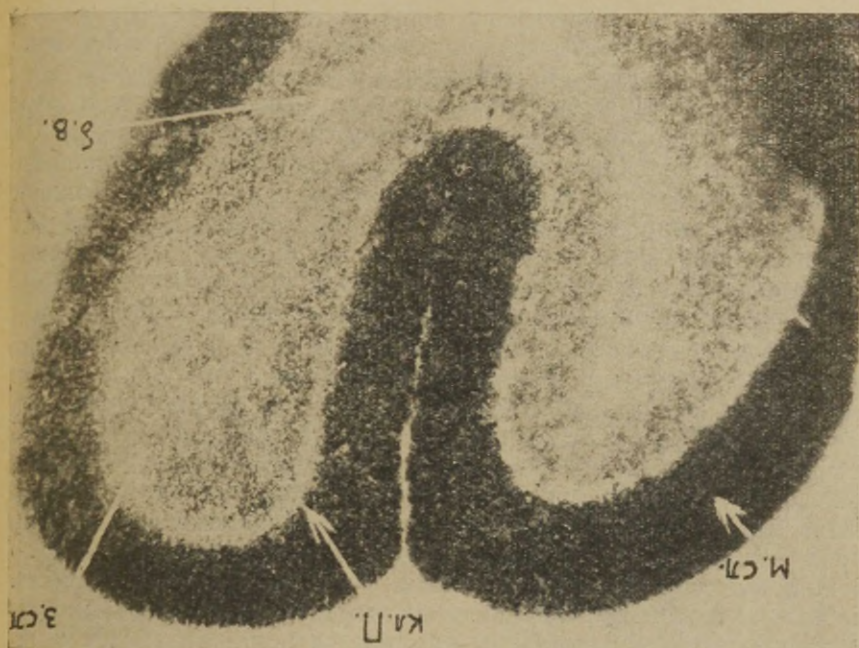






Рис. 5. Гистохимическая реакция на АХЭ в мозжечке некоторых позвоночных. Тиохолиновый метод Кёлле, модификация Жеребцова.

5а — мозжечок рыбы (судак), АХ, инкубация 2 часа, сильная реакция АХЭ в зернистом слое (з. сл.) коры мозжечка и в белом веществе (б. в.); более слабая реакция в отдельных зонах молекулярного слоя (м. сл.); слой клеток Пуркинье (кл. П.) не дает реакции АХЭ.

5б — мозжечок птицы (горихвостка), АХ, инкубация 3 часа; сильная реакция АХЭ в молекулярном слое (м. сл.), зернистый слой (з. сл.) почти не окрашен, слой клеток Пуркинье (кл. П.) не окрашен.

5в — мозжечок птицы (ласточка), АХ, инкубация 3 часа; реакция АХЭ в зернистом слое (з. сл.), слабая реакция в молекулярном слое (м. сл.) отдельных долек мозжечка; слой клеток Пуркинье (кл. П.) не окрашен.

позвоночных (по 25 видов в классах рыб и птиц, по 7 видов рептилий и млекопитающих), нашла, что у всех домлекопитающих форм в 65—70% случаев реакция на АХЭ преобладает в молекулярном слое, но в каждом классе все же встречаются виды, у которых реакция преобладает в зернистом слое мозжечка (рис. 5, а, в). У млекопитающих чаще встречается локализация гистохимической реакции на АХЭ в зернистом слое мозжечка, однако, у четырех из девяти исследованных видов млекопитающих (летучая мышь, морская свинка, собака, человек) гистохимически была обнаружена реакция на АХЭ в молекулярном слое мозжечка. Биохимические определения на гомогенатах, приготовленных отдельно из молекулярного и зерни-

Активность АХЭ по слоям коры мозжечка у некоторых позвоночных  
(мкМ АХ/1 г вл. веса/1 час)

Класс и вид	Активность АХЭ		Белое вещество мозжечка
	Молекулярный слой	Зернистый слой	
Рыбы			
Карась *	850	520	
Карп *	780	1340	
Птицы			
Голубь	1990	1640	
Голубь	1125	1070	440
Синица *	480	420	
Синица	520	720	
Млекопитающие			
Кошка (червь) *	720	1050	590
(полушария)	716	810	690
Кошка (полушария) *	525	560	400
Кролик (червь) *	332	322	200
(полушария)	328	350	
Крыса (червь) *	408	280	206

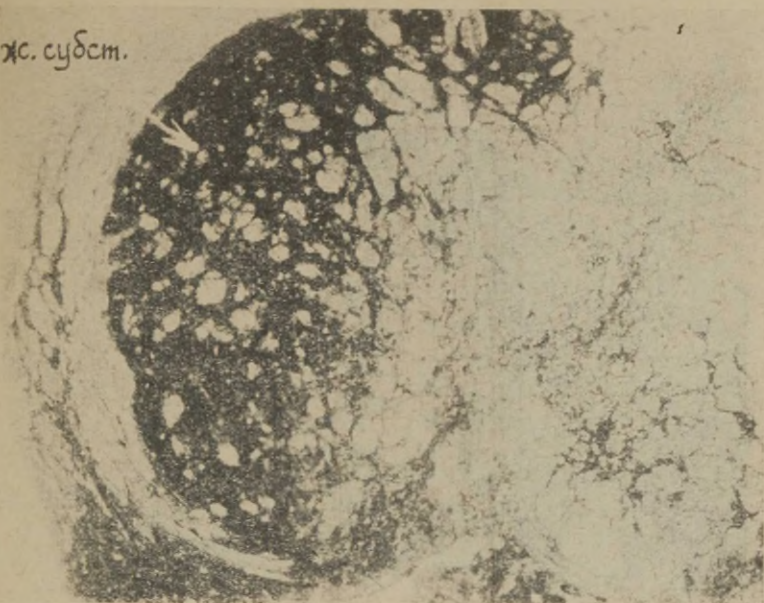
\* Гистохимическая реакция АХЭ резко преобладает в зернистом слое мозжечка.

стого слоев коры мозжечка, сделанные у видов с резко выраженной «зернистой» локализацией гистохимической реакции на АХЭ, однако, показали, что АХЭ активность у них почти равномерно распределена в обоих слоях мозжечка. По-видимому, наличие глиального барьера, не допускающего у ряда видов соприкосновения внешнего субстрата АХ с АХЭ волокон молекулярного слоя, является причиной этого несоответствия результатов био- и гистохимического определений. Вопрос, однако, еще недостаточно изучен.

Все приведенные данные и сопоставления дают основание предполагать, что кору мозжечка высших животных можно рассматривать как область, в которой мембраны нейронов находятся на уровне дифференцировки, свойственном всем структурам, выполняющим регулируемую функцию, воздействующим на афферентный поток импульсов в месте их переключения на следующий нейрон. Для этой области характерна высокая активность АХЭ, диффузное ее распределение в нейронах, низкая активность ХА, т. е. все признаки, отличающие систему АХ всех отделов мозга низших водных холоднокровных позвоночных.



ж. сист.



а

ж. с.



б





Рис. 6. Гистохимическая реакция АХЭ в желатинозной субстанции мозга позвоночных.

- 6 а — Реакция АХЭ в желатинозной субстанции (ж. субст.) тройничного нерва скота, АХ, инкубация 2 часа.
- 6 б — Реакция АХЭ в желатинозной субстанции (ж. субст.) задних рогов спинного мозга птицы (певчий дрозд), АХ, инкубация 2 часа.
- 6 в — Реакция АХЭ в желатинозной субстанции (ж. субст.) задних рогов спинного мозга кролика, АХ, инкубация 2 часа.

Другой областью в центральной нервной системе высших животных, также расположенной на пути переключения афферентных импульсов и во многом сходной морфологически с молекулярным слоем коры мозжечка (структура нейропиля, синапсы перекрестного типа, наличие замкнутых путей, обеспечивающих длительно циркулирующее возбуждение в пределах структуры), является желатинозная субстанция мозга (44—49). Высокая активность АХЭ в желатинозной субстанции обнаружена нами у всех позвоночных, начиная с низших рыб (5; рис. 6). Ряд авторов приписывают этой структуре функцию модуляции афферентного потока импульсов в месте их переключения на следующий нейрон (47, 48).

Из этих примеров нам представляется возможным сделать вывод, что и в ЦНС высших животных система АХ связана не только с информационной функцией холинэргических синапсов,

обеспечивая распространение импульса по рефлекторной дуге, а выполняет и другую важнейшую функцию регуляции — настройки афферентных импульсов. Эта вторая функция выполняется нервными структурами, лежащими вне рефлекторных путей, но тесно связанных с ними. В этих структурах под влиянием афферентных импульсов поддерживается длительно циркулирующее состояние возбуждения. Система АХ этих областей сохраняет признаки, свойственные системе АХ всех областей мозга рыб.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Feldberg W., Arch. Intern. Physiol., **59**, 544, 1951.
2. Hebb C. O., Intern. Rev. Neurobiol., **1**, 165, 1959.
3. Hebb C. O., Ratković D., 'Comparative Neurochemistry' ch. VI, ed. D. Richter, Pergam. Press, N-Y., 1964.
4. Вержбинская Н. А., В сб.: Эволюция функций. Изд. «Наука», М.—Л., 219, 1964.  
Вержбинская Н. А., Труды 3-й Всес. конфер. по биохимии нервной системы, Ереван, 503, 1963.
5. Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., Сб.: Функциональная эволюция нервной системы, 41, изд. «Наука», Л., 1965.  
Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., Сб.: Вопросы нейрхимии, изд. «Наука», Л., 1966.
6. Hebb C. O., Smallman B. N., J. Physiol., **134**, 385, 1956.
7. Krebs H., Biochim. Biophys. Acta, **4**, 249, 1951.
8. Stone W. E., Arch. Biochem. Biophys., **59**, 181, 193, 1955.
9. Koelle G. A., Friedenwald N., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **70**, 917, 1949.
10. Gerebtzoff M. A., "Cholinesterases", Pergam. Press., N-Y., 1959.
11. Feldberg W., Mann T., J. Physiol., **104**, 411, 1946.
12. Feldberg W., Vogt M., J. Physiol., **107**, 372, 1948.
13. Wadja A., цит. по Feldberg W., Arch. Intern. Physiol., **59**, 544, 1951.
14. Zetler E. et al., цит. по Feldberg W., Arch. Intern. Physiol., **59**, 544, 1951.
15. Hebb C. O., Quart. J. Exp. Physiol., **40**, 176, 1955.
16. Hebb C. O., Silver A., J. Physiol., **134**, 718, 1956.
17. Nachmansohn D., Chemical and molecular basis of nerve activity, Perg. Press. N-Y., 1959.  
Nachmansohn D., J. of Mount Sinai Hospital, XXXI, 549, 1964.
18. Вержбинская Н. А., Сб.: Биохимия нервной системы, Киев, 1954.
19. Крепс Е. М., Вержбинская Н. А., Изв. АН СССР, сер. биол., **6**, 855, 1959.
20. Лейбсон Н. Л., ДАН СССР, **153**, 1435, 1963; Цитология, **5**, 679, 1963.
21. Вержбинская Н. А., Лейбсон Н. Л., Изв. АН СССР, сер. биол. (в печати).
22. Бузников Г. А., Автореферат докторской диссерт. Л., 1966.
23. Koelle G. B., J. Pharmac. a. Pharmacol., **14**, 65, 1962.
24. Gray E. G., J. Anat., **95**, 345, 1961.
25. Hamori A., Szentágothai J., Acta Biol. Acad. Sci. Hungarica, **15**, 95.
26. Fox C. A., "Correlative Anatomy of the Nervous System", ed. E. C. Crosby, T. Humphrey, E. W. Lauer, 193, N-Y, MacMillan, 1962.
27. Fox C. A., Siegesmund K. A., Dutta C. P., "Morphological a. Biochemical Correlates of Neural Activity, 112, ed. R. S. Snider, N. Hoerber-Harper, 1964.
28. Crawford J. M., Curtis D. R., Voorhoeve P. E., Wilson V. I., Nature, **200**, 579, 1963.

29. McCance J., Phillis J. W., *Nature*, **204**, 844, 1964.
30. Austin L., Phillis J. W., **12**, 709, 1965.
31. Phillis J. W., *Experientia*, **21**, 266, 1965.
32. Curtis D. R., Crowford J. M., *Nature*, **206**, 4983, 1965.
33. Eccles J., *Perspect. Biol. a. Med.*, **8**, 3, 289, 1965.
34. Shute C. C. D., Lewis P. R., *Nature*, **199**, 1160, 1963; *Nature*, **242**, 4968, 1965.
35. Sperti L., Sperti S., *Experientia*, **15**, 441, 442, 1959.
36. Mean C. O., v. der Loos H., *Anat. Res.*, **148**, 311, 1964.
37. Friede R. L., Fleming L. M., *J. Neurochem.*, **11**, 1, 1964.
38. Kasa P., Csillic B., *Nature*, **208**, 695, 1965.
39. Боровягин В. Л., Сахарова А. В., Сахаров Д. А., *Биофизика*, **11**, 83, 1966.
40. Лейбсон Н. Л., Ж. эволюц. биохимии и физиол. (в печати).
41. Capuro S., Zaccaro D., Viale G., *C. r. Ass. Anat.*, **46**, 146, 1960.
42. Cavanagh J. B., Holland P., *Nature (London)*, **190**, 735, 1961.
43. Szentágothai J., *Excerpta med. (Amst.)*, sect. 11, 89, 1963.  
Сентаготай Дж., Сб.: Рефлексы головного мозга, 178, изд. «Наука», М., 1965.
44. Szentágothai J., Kiss T., *Arch. Neurol. Psychiat.*, **62**, 734, 1949.
45. Szentágothai J., *J. Comp. Neurol.*, **122**, 219, 1964.
46. Pearson M., *Arch. Neurol. Psychiat.*, **68**, 515, 1952.
47. Wall P. D., *J. Neurophysiol.*, **23**, 197, 1960.  
Wall P. D., *J. Physiol.*, **164**, 508, 1962.
48. Иоселиани Т. К., *Физиол. журн. СССР*, **47**, 1253, 1961.
49. Жукова Г. П., *Успехи соврем. биол.*, **61**, 57, 1966.



## ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕОТИДОВ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ

М. Д. Курский, А. Н. Федоров, О. Н. Зряков

Институт биохимии АН Укр. ССР, Киев

За последние годы к изучению биологической роли серотонина (5-гидрокситриптамина) значительно возрос интерес биохимиков. Достаточно детально изучены распределение, связь и влияние его на функциональное состояние ЦНС и очень немного известно о влиянии этого биогенного амина на обмен веществ в ЦНС и в целом организме.

Сравнительно мало можно найти данных о влиянии серотонина на процессы окисления и связанное с ними фосфорилирование, которое в значительной мере отражает динамику метаболизма в живом организме. Имеющиеся отдельные работы по этому вопросу неоднозначны и противоречивы (1—3). Однако изучение процессов окислительного фосфорилирования в ЦНС, на наш взгляд, представляет значительный теоретический интерес, так как в нарушении их усматривается одна из причин возникновения психических расстройств (4).

Изменения функционального состояния ЦНС вызывают изменения дыхания не только в ткани мозга, но и в других органах, в частности в печени (5). Существует мнение о связи психических расстройств с нарушением функции печени (6, 7). Это побудило нас заняться изучением влияния серотонина на дыхание и содержание нуклеотидов в ткани головного мозга и печени кроликов.

### Методика

Опыты проводились на взрослых кроликах весом 2,0—2,5 кг. Серотонин (креатинсульфатсеротонин) вводили в большую цистерну мозга в дозе 0,05 мг на 1 кг веса. Через 1 час после введения серотонина животных декапитировали; для определения нуклеотидов голову мгновенно замораживали в жидком воздухе.

Нуклеотиды разделяли методом двухмерной бумажной хроматографии (8) и определяли спектрофотометрически (9).

Потребление кислорода митохондриями мозга измеряли полярографическим методом (10). Реакционная смесь содержала 20 мкМ двузамещенного фосфата натрия, 10 мкМ хлористого магния, 150 мкМ хлористого калия, 10 мкМ сукцината, 0,03 мг гексокиназы, 9 мг глюкозы, 3 мг АТФ. К общему объему смеси (1 мл, рН 7,4) добавляли 0,2 мл митохондрий, содержащих 1,5 г/100 мл белка.

Неорганический фосфор определяли по Делори (11).

Об окислении, сопряженном с фосфорилированием, судили по соотношению потребляемого кислорода митохондриями при наличии в инкубационной смеси полной системы (АТФ, гексокиназа, глюкоза) к потребленному кислороду при неполной системе фосфорилирования (без АТФ и гексокиназы), т. е. по контролю дыхания системами фосфорилирования (10).

## Результаты исследований

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что серотонин в опытах *in vivo* значительно снижает потребление кислорода митохондриями мозга кроликов и повышает дыхательный контроль. В опытах *in vitro* ( $5 \cdot 10^{-4}$  мг серотонинкреатинсульфата на г белка) наблюдается также значительное снижение потребления кислорода митохондриями мозга, но отмечается и уменьшение дыхательного контроля (таблица 2).

Таблица 1

Влияние серотонина на дыхание (в мкМ  $O_2$  3 мин/мг белка) митохондрий мозга кроликов в опытах *in vivo*

		а ( $M \pm m$ )	б ( $M \pm m$ )	а/б ( $M \pm m$ )
Контроль	11	$47,1 \pm 2,9$	$31,9 \pm 1,18$	$1,47 \pm 0,07$
Опыт	8	$44,4 \pm 2,1$	$24,0 \pm 2,01$	$1,85 \pm 0,04$
Р				$< 0,001$

а — полная система: АТФ + гексокиназа + глюкоза;

б — система только с глюкозой.

Таблица 2

Влияние серотонина на дыхание (в мкМ  $O_2$  3 мин/мг белка) митохондрий мозга кроликов в опытах *in vitro*

		а ( $M \pm m$ )	б ( $M \pm m$ )	а/б ( $m \pm m$ )
Контроль	11	$47,1 \pm 2,9$	$31,9 \pm 1,18$	$1,47 \pm 0,07$
Опыт	7	$31,8 \pm 2,31$	$26,1 \pm 2,30$	$1,22 \pm 0,02$
Р				$< 0,01$

а — полная система: АТФ + гексокиназа + глюкоза;

б — система только с глюкозой.

При изучении процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в гомогенатах различных отделов головного мозга и печени установлено, что серотонин в опытах *in vivo* увеличивает потребление кислорода в больших полушариях, стволе головного мозга, мозжечке и печени при наличии в инкубационной среде глюкозы, гексокиназы и АТФ. В среде, содержащей только глюкозу, серотонин снижает потребление кислорода в больших полушариях и мозжечке, увеличивает незначительно в стволе и значительно в печени (таблица 3). Во всех изучаемых отделах

Таблица 3

Влияние серотонина на дыхание (в мкМ  $O_2$  3 мин/мг белка) гомогенатов печени и разных отделов мозга кролика

Исследуемый препарат	а ( $M \pm m$ )	б ( $M \pm m$ )	а/б ( $M \pm m$ )
Большие полушария головного мозга			
Контроль	$16,7 \pm 4,5$	$15,8 \pm 2,2$	$1,04 \pm 0,184$
Опыт	$19,7 \pm 5,4$	$9,9 \pm 1,2$	$1,57 \pm 0,270$
Стволовая часть головного мозга			
Контроль	$13,6 \pm 2,5$	$8,3 \pm 0,97$	$1,59 \pm 0,360$
Опыт	$32,0 \pm 5,5$	$10,9 \pm 3,40$	$2,94 \pm 0,600$
Мозжечок			
Контроль	$21,0 \pm 3,52$	$14,2 \pm 3,12$	$1,94 \pm 0,148$
Опыт	$25,9 \pm 5,30$	$6,8 \pm 1,45$	$4,64 \pm 0,590$
Печень			
Контроль	$9,7 \pm 2,30$	$6,5 \pm 1,60$	$1,56 \pm 0,216$
Опыт	$37,5 \pm 1,47$	$15,6 \pm 1,30$	$2,40 \pm 0,410$

а — полная система: АТФ + гексокиназа + глюкоза;

б — система только с глюкозой.

мозга и в печени под влиянием серотонина увеличивается дыхательный контроль, что указывает на усиление окисления, сопряженного с фосфорилированием, которое связано с образованием макроэргических соединений. В связи с этим мы поставили опыты по изучению содержания нуклеотидов в ткани мозга и печени. Результаты этих исследований представлены в таблице 4, из которой видно, что серотонин вызывает достоверное повышение содержания АТФ и ГТФ в больших полушариях и мозжечке, причем в мозжечке это повышение больше, чем в больших полу-



Влияние серотонина на содержание нуклеотидов и неорганического фосфора  
в ткани головного мозга и печени кроликов  
(мкМ/г ткани)

Соединения	К-во опытов	Контроль $M \pm m$	К-во опытов	Опыт $M \pm m$
Большие полушария головного мозга				
АТФ	7	$0,91 \pm 0,06$	8	$1,10 \pm 0,06$
АДФ	7	$0,61 \pm 0,03$	8	$0,74 \pm 0,08$
ГТФ	7	$0,40 \pm 0,03$	8	$0,48 \pm 0,03$
Неорганический фосфор	5	$4,25 \pm 0,10$	5	$3,64 \pm 0,12$
Мозжечок				
АТФ	7	$0,64 \pm 0,05$	8	$0,91 \pm 0,10$
АДФ	7	$0,64 \pm 0,08$	8	$0,67 \pm 0,04$
ГТФ	7	$0,33 \pm 0,05$	8	$0,51 \pm 0,04$
Неорганический фосфор	5	$4,75 \pm 0,06$	5	$4,40 \pm 0,55$

шариях, как и величина дыхательного контроля. В больших полушариях увеличивается количество АДФ, а в мозжечке оно почти не изменяется. По предварительным данным, содержание изучаемых нуклеотидов в печени изменяется в незначительной мере.

Количество неорганического фосфора снижается в больших полушариях больше (0,61 мкМ), чем в мозжечке (0,35 мкМ).

### Обсуждение результатов

Установлено, что процесс окислительного фосфорилирования в клетке может находиться в состоянии прочного сопряжения, слабого сопряжения (или частичного разобщения) и полного разобщения (12). Считают, что при прочносопряженном окислительном фосфорилировании митохондрии потребляют кислород в отсутствии АДФ в незначительной степени. При частичном разобщении потребление кислорода в отсутствии АДФ идет в большей степени. При прочном сопряжении отношение количества кислорода, потребленного в присутствии АДФ, к количеству кислорода, потребленного митохондриями без АДФ (или без системы), в определенной мере отражает степень поглощения фосфора, а значит и степень образования АТФ.

Согласно общепринятому мнению, дыхательный контроль прочносопряженных митохондрий близок или выше 3 (10). Ды-

хательный контроль митохондрий, выделенных в наших условиях, при использовании в качестве субстрата сукцината, близок к 2, что указывает на небольшое разобщение окислительного фосфорилирования; можно думать, что это является особенностью мозга.

Введенный интрацистерально, серотонин снижает потребление кислорода без АДФ, не уменьшая, а повышая поглощение его в присутствии системы, обеспечивающей улавливание энергии в форме макроэргических связей. В данном случае складывается такое впечатление, что серотонин усиливает сопряженность окисления с фосфорилированием, изменяя направление потока электронов на цепь окислительного фосфорилирования с цепи свободного окисления или другим путем. В пользу этого предположения говорит факт увеличения количества АТФ и других нуклеотидов как в больших полушариях мозга, так и в мозжечке.

Большая интенсивность поглощения кислорода (разница потребления кислорода тканью с системой и без системы) и увеличение количества нуклеотидов в мозжечке по сравнению с большими полушариями, вероятно, связаны с функциональными особенностями этого отдела, а также с тем, что в состав больших полушарий входит значительное количество белого (проводникового) вещества с низкой интенсивностью обмена.

В опытах *in vitro* серотонин действует несколько по-другому: незначительно снижает потребление кислорода без системы и в значительно большей мере с системой; величина дыхательного контроля уменьшается, что указывает на разобщение окисления с фосфорилированием. Эти данные в некоторой степени согласуются с данными Аливизатоса и других (13), которые установили, что серотонин в опытах *in vitro* разобщает окислительное фосфорилирование, но, в противоположность нашим данным, усиливает потребление кислорода.

Различия во влиянии серотонина на окислительные процессы между данными Аливизатоса и нашими, вероятно, можно объяснить как особенностями объекта (Аливизатос исследовал митохондрии печени), так и разными дозами: мы применяли небольшие дозы серотонина, тогда как Аливизатос очень большие. При введении малых и больших доз серотонин обуславливает различный уровень метаболических процессов в мозгу, что связано, по-видимому, с различным функциональным состоянием ЦНС (14). Возможно и *in vitro* разные дозы серотонина также оказывают разное действие на обменные процессы.

Отмеченное в нашей работе повышение потребления кислорода митохондриями мозга при инкубации с полной системой при интрацистеральном введении серотонина согласуется с данными Миткиевского (15), исследовавшего поглощение кислорода срезами мозга при введении внутривенно и внутрибрю-



шинно предшественника серотонина — 5-гидрокситроптофана, легко проникающего через гемато-энцефалический барьер и быстро превращающегося в серотонин в ткани мозга.

Но серотонин известен как медиатор и вещество гормонального типа действия. Поэтому оно вызывает то или иное физиологическое состояние вегетативных и других центров, т. е. действует на центральную часть рефлекторной дуги орган — центр — орган, что, в свою очередь, может вызвать те или иные изменения в обмене веществ в органе. Кроме того, подвергаясь ферментативным действиям в мозгу, он превращается в ряд продуктов, которые с кровью могут попасть в другие органы и вызвать в них определенные изменения. Как известно, состояние метаболизма других органов, в частности печени, чрезвычайно важно для функции мозга. Поэтому нами было проведено исследование интенсивности окислительного фосфорилирования в печени после внутрицистернального введения серотонина. Полученные результаты показали, что через час после такого введения серотонина поглощение кислорода гомогенатами печени с полной системой активировалось в значительной степени, но в данном случае повышалась и интенсивность свободного окисления, так что степень сопряженности была не очень большой по сравнению с нормой.

При внутривенном и внутрибрюшинном введении серотонина Миткиевский (16, 17) отмечал уменьшение потребления кислорода тканью печени и почек. Эти данные, по-видимому, указывают на различие прямого действия серотонина и рефлекторного. Не исключено также, что действие могут оказывать и продукты его обмена.

Полученные нами результаты показали, что в гомогенатах серотонин стимулирует потребление кислорода в 2—3 раза больше по сравнению с митохондриями. Выше в гомогенатах и степень сопряженности окислительного фосфорилирования под влиянием серотонина. Возможно, в этом сказывается отсутствие полного набора кофакторов, принимающих участие в функции цельной клетки.

На основании изучения электронного парамагнитного резонансного спектра установлено существование серотонина в организме в форме свободного радикала, что характеризует его высокую реакционную способность в комплексообразовании с коэнзимами (18). Установлено также, что пиридиновые и изоаллоказиновые компоненты коэнзимов могут взаимодействовать с производными индола, к числу которых относится и серотонин, с образованием комплекса с переносом заряда (19). В присутствии НАДФ и НАД серотонин стимулирует окисление 1-С<sup>14</sup>-глюкозы и активирует трансгидрогеназную систему в передней доле гипофиза свиньи (20, 21), окисление 6-фосфо-(1-С<sup>14</sup>-)глюконата в передней доле гипофиза быка (22), стимулирует



неэнзиматическое восстановление НАД (23). Серотонин является мощным медиатором неферментативного восстановления цитохрома С за счет НАД-Н<sub>2</sub>; не стимулирует аэробное окисление НАД-Н<sub>2</sub> пероксидазой из хрена в присутствии ионов марганца и заметно конкурирует с 17-β-эстрадиолом в этой системе (24, 25).

Шелленберг (26), изучая участие триптофана в реакции переноса водорода, установил, что при дегидрировании этилового спирта, меченого тритием, метится алкогольдегидрогеназа. После кислотного гидролиза белка метка обнаруживалась в триптофане. Эти результаты указывают на то, что, по-видимому, триптофановые остатки фермента являются интермедиантами в переносе водорода от субстрата к НАД по такой схеме:

энзим-индол + НАД = энзим-индоленин + НАД-Н<sub>2</sub>,

энзим-индоленин + субстрат = энзим-индол + окисленный продукт реакции.

Каков механизм действия серотонина на процесс окисления и сопряженного с ним фосфорилирования, пока что трудно сказать, но можно предполагать, что этот биогенный амин имеет какое-то отношение к транспорту электронов. Такое предположение вытекает из вышеприведенных литературных и собственных данных.

Сцент-Дьердьи высказал предположение, что биологически активные индолы могут контролировать реакции, в которых принимают участие пиридиновые и флавиновые коэнзимы и что физиологическое действие производных индола, и в первую очередь серотонина, связано с образованием комплексов, осуществляющих перенос заряда на соответствующие рецепторы (27).

Так ли это, или нет, пока что трудно сказать, но идея заслуживает внимания и побуждает нас проводить дальнейшие исследования.

## Выводы

Серотонин вызывает:

- 1) в опытах *in vivo*
  - а) снижение потребления кислорода митохондриями ткани головного мозга и повышает дыхательный контроль;
  - б) увеличение потребления кислорода гомогенатами больших полушарий, ствола головного мозга, мозжечка и печени с увеличением дыхательного контроля;
  - в) повышение содержания АТФ, ГТФ и АДФ в больших полушариях, АТФ и ГТФ в мозжечке и незначительное снижение неорганического фосфора в обоих отделах;
- 2) в опытах *in vitro* ( $5 \cdot 10^{-4}$  г/г белка) снижение потребления кислорода митохондриями мозга и величину дыхательного контроля.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Salgarello G., Boll. soc. ital. biol. speriment., **31**, 786, 1955.
2. Tonini G., De Risio C., Boll. soc. ital. biol. speriment., **32**, 27, 1955.
3. Melching H., Ernest H., Rösler H., Strahlentherapie, **113**, 394, 1960.
4. Saunders J. C., Биохимия психозов, М., **136**, 1963.
5. Сквирская Э. Б., Чепинога О. П., Укр. біохім. ж., **24**, 598, 1952.
6. Reiter P. J., Z. ges. neurol. Psychiatr., **160**, 598, 1938.
7. Baruk H. J., J. Nerv. Ment. Dis., **110**, 218, 1949.
8. Нечипоренко З. Ю., Укр. біохім. ж., **30**, 402, 1958.
9. Спирин А., Белозерский А., ДАН СССР, **113**, 650, 1957.
10. Chance B., Williams G. R., Nature, **175**, 1120, 1955.
11. Delory L. E., Biochem. J., **32**, 1162, 1938.
12. Скулачев В. П., Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, 1962.
13. Alivisatos S. G. A., Ungar G., Collaghan O., Biava C., Nature, **201**, 47, 1964.
14. Рапопорт С. Я., Зубков С. Р., Щерс Н. В., Проблемы гистогематических барьеров, М., **160**, 1965.
15. Mietkiewski E., Jankowska I., Acta physiol. Polon., **13**, 5, 11, 1962.
16. Mietkiewski E., Jankowska I., Wien. Klin. Wchs., **37**, 642, 1960.
17. Mietkiewski E., Jankowska I., Acta physiol. Polon., **12**, 5, 17, 1961.
18. Borg D. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **53**, 829, 1965.
19. Mulliken R. S., J. Phys. Chem., **56**, 801, 1952.
20. McGuire J., de Roy Pesch., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **48**, 215, 7, 1962.
21. McGuire J., Fanning H., Feder. Proc., **22**, 409, 1963.
22. Barondes S. H., Field J., Biochem. Biophys. Acta, **73**, 324, 1963.
23. Alivisatos S. G. A., Mourkides G. A., Jibril A., Nature, **186**, 718, 1960.
24. Williams-Ashman H. G., Cassman M., Klavins M., Nature, **184**, 427, 1959.
25. Alivisatos S. G. A., Williams-Ashman H. G., Biochem. Biophys. Acta, **86**, 392, 1964.
26. Schellenberg K. A., J. Biol. Chem., **240**, 1165, 1965.
27. Karreman G., Isenberg I., Szent-Gyorgyi A., Science, **130**, 1191, 1958.

## СИСТЕМА $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ПРИ ОБЩЕМ РЕНТГЕНОВСКОМ ОБЛУЧЕНИИ

И. А. Сытинский, Г. И. Сазонец, Шан Кэ-цзинь

Лаборатория биохимии нервной системы института им. А. А. Ухтомского  
Ленинградского университета, Ленинград

ГАМК является низкомолекулярным биоактивным веществом, которое оказывает тормозящее действие на биоэлектрическую активность нервной системы позвоночных. Исследование уровня ГАМК и активности ферментов ее обмена в мозгу животных, подвергшихся общему рентгеновскому облучению, представляет интерес для оценки роли нервной регуляции при лучевом поражении. В литературе почти не имеется сведений о влиянии ионизирующей радиации на систему ГАМК (Nischi и др., 9; Мусаев-Лян, Сытинский, 4; Сотникова, Сытинский, 5; Лыонг Тан Чыонг и др. 3; Сытинский, Шан Кэ-цзинь, 6).

В связи с этим, в настоящей работе мы определяли содержание ГАМК и активность ферментов ее обмена: глутаматдекарбоксилазы (ГДК), аминоферазы ГАМК и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты (ГАМК-АМ) в головном мозгу белых крыс в разные сроки после общего рентгеновского облучения их дозой в 800 р.

### Методика

В опыт брали белых крыс весом около 150—200 г. Общее рентгеновское облучение в дозе 800 р проводили при помощи аппарата РУМ-11 при следующих технических условиях: сила тока 20 ма, напряжение на трубке 180 кв, фильтр 0,5 мм Al, кожно-фокусное расстояние 104 см.\*

Для определения в мозгу крыс уровня ГАМК и глутаминовой кислоты (ГК) животных целиком замораживали в жидком азоте спустя 5 час после облучения и на 1, 3, 4, 5, 6, 7 и 10-е сутки развития лучевой болезни. Количественное определение ГАМК производили посредством бумажной хроматографии со спектрофотометрическим определением интенсивности окраски проб (Шатунова, Сытинский, 8). Для определения в ткани мозга активности ферментов обмена ГАМК животных убивали декапитацией. Об активности

\* Приносим благодарность А. С. Белому (Институт цитологии АН СССР) за оказание технической помощи при облучении животных.



ферментов судили по приросту содержания конечных продуктов ферментативных реакций (Sytinskii, Priyatkina, 10). О функциональном состоянии головного мозга облученных крыс судили по его биоэлектрической активности. Отведение мозговых потенциалов осуществляли биполярным способом; стальные игольчатые электроды вводили в кости черепной коробки в районе лобной, теменной и затылочной долей. Межэлектродное расстояние равнялось 10 мм. Регистрацию биопотенциалов производили чернилопишущим осциллографом фирмы Альвар. Частотная характеристика усилителя 0—75 гц. Данные опытов статистически обрабатывались по методу Фишера—Стьюдента (Фишер, 7).

## Результаты опытов и их обсуждение

Результаты опытов по определению уровня ГАМК и активности ферментов ее обмена в мозговой ткани облученных крыс в разные сроки развития лучевой болезни представлены в таблице. Статистически достоверное увеличение на 15—16% содержания ГАМК в мозгу крыс отмечено на 4—6-е сутки после общего облучения дозой в 800 р. Затем уровень доходит до нормальных величин, а на 10-е сутки намечается тенденция к снижению. Объяснить прирост ГАМК за счет увеличения активности ГДК не представляется возможным. В течение всех 10 дней после облучения активность ГДК не изменялась. Данные опытов по изучению активности ГАМК-АМ показали, что активность

Таблица

Система ГАМК в мозгу крыс после общего рентгеновского облучения дозой 800 р ( $M \pm m$ ; в скобках — количество опытов)

Сроки после облучения	ГАМК мг%	Активность ГДК мкмоль ГАМК/г мозга/час	Активность ГАМК-АМ мкмоль ГК (г мозга/час)
Контроль	$18,5 \pm 0,8$ (18)	$18,8 \pm 0,4$ (20)	$23,8 \pm 3,6$ (10)
5 час	$19,2 \pm 2,0$ (5)	$18,7 \pm 1,6$ (5)	—
1 день	$18,3 \pm 2,0$ (4)	$18,3 \pm 0,9$ (10)	$25,9 \pm 0,9$ (14)
2 "	—	—	$26,0 \pm 1,2$ (5)
3 "	$18,6 \pm 0,6$ (12)	$19,1 \pm 0,9$ (14)	$28,9 \pm 0,8$ (5)
4 "	$22,0 \pm 2,0$ (5)	—	$25,6 \pm 0,5$ (6)
5 "	$21,5 \pm 1,7$ (11)	$19,0 \pm 0,6$ (13)	$24,2 \pm 0,4$ (8)
6 "	$20,0 \pm 0,6$ (11)	$20,2 \pm 1,0$ (4)	$23,8 \pm 0,7$ (5)
7 "	$19,8 \pm 0,8$ (7)	$19,2 \pm 2,0$ (3)	$22,1 \pm 1,4$ (8)
8 "	—	$19,3 \pm 1,0$ (5)	$21,2 \pm 0,5$ (5)
9 "	—	—	$20,9 \pm 0,8$ (8)
10 "	$17,3 \pm 1,4$ (9)	$19,5 \pm 1,4$ (5)	—

фермента достоверно возрастает почти на 22% в мозгу животных на третий день после их общего облучения. Падение ферментативной активности в ткани мозга происходит только на 9-й день после облучения.

Выявленное в опытах несоответствие между активностью ферментов обмена ГАМК и ее уровнем в мозгу, вероятно, объяс-

няется неадекватностью условий экспериментов по определению содержания ГАМК и активности ферментов ее обмена в пробах ткани мозга и проявлением действия ферментов системы ГАМК непосредственно в мозгу. Уровень ГАМК определяли в мозгу животных, которых целиком замораживали в жидком азоте, что позволяло довольно быстро фиксировать определенное функциональное состояние ЦНС. Содержание ГАМК в мозгу животных, убитых обезглавливанием, примерно на 50% выше по сравнению с уровнем ГАМК в мозгу животных, целиком замороженных в жидком азоте. Однако общая тенденция увеличения содержания ГАМК на 3—5-е сутки после облучения выявляется и при этом способе обработки мозговой ткани. Для проявления активности ферментов системы ГАМК в гомогенатах мозговой ткани мы создавали оптимальные условия pH и температуры и анаэробную среду. Любое изменение этих условий в мозгу по сравнению с нормой может привести к сдвигу уровня ГАМК вследствие изменения скорости ферментативных реакций или в результате конкуренции ферментов обмена ГАМК за их кофермент — пиридоксальфосфат из-за его недостаточного образования. Использование в опытах целого мозга животных не позволяет также учитывать возможные различия внутриклеточного распределения компонентов системы ГАМК, имеющие место при развитии лучевой болезни.

В наших опытах не удалось также выявить уменьшения уровня глутаминовой кислоты, соответствующего повышению содержания ГАМК в мозгу облученных крыс. Некоторая тенденция к уменьшению содержания ГК в мозгу крыс была выявлена на 5-е сутки после облучения животных, но лишь на 10-е сутки было показано достоверное снижение ее уровня на 23% по сравнению с содержанием в мозгу здоровых крыс.

Исследования биоэлектрической активности головного мозга крыс, подвергнутых ионизирующему облучению, проведенные параллельно с количественным определением ГАМК, показали изменения электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в течение различных периодов лучевой болезни. Депрессия биоэлектрической активности, выражающаяся в появлении медленных ритмов, наиболее отчетливо проявлялась на 3 сутки. Тем самым создается впечатление, что увеличение уровня ГАМК соответствует развитию состояния торможения ЦНС, которое достигает своего максимума на 3—4-е сутки развития лучевой болезни (Лебединский, Нахильницкая, 2). При ионизирующей радиации наблюдается также усиление гликолиза с одновременным нарушением утилизации кислорода мозговой тканью и возникновением гипоксии (Коштыянец и др., 1), что тоже может способствовать накоплению ГАМК в нервных клетках. Объяснить увеличение активности ГАМК-АМ на третий день после облучения животных пока не представляется возможным. По всей вероятности, это может



быть обусловлено воздействием различных свободных радикалов и перекисных соединений, образующихся в организме в течение развития лучевой болезни. Несовершенство методических приемов по определению активности ферментов в работах по функциональной биохимии ЦНС указывает на необходимость проведения исследований по изучению структуры и свойств энзимов системы ГАМК. По всей вероятности, лишь знание физико-химических свойств ферментов системы ГАМК и выяснение их субклеточного распределения в нервных клетках животных, подвергнутых ионизирующей радиации, даст представление об особенностях обмена ГАМК в нервной системе при лучевом поражении.

### Резюме

Исследование эффекта общего рентгеновского облучения крыс дозой в 800 р показало статистически достоверное увеличение на 15—16% содержания ГАМК в мозгу животных на 4—6-е сутки после облучения. Это увеличение уровня ГАМК в мозгу облученных животных не сопровождается адекватным изменением активности ферментов ее обмена — ГДК и ГАМК-АМ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Коштыяниц Х. С., Турпаев Т. М., Рыбкина Д. Е., Сессия АН СССР по мирному использованию атомной энергии. Засед. отд. биол. наук, 289, 1955.
2. Лебединский А. В., Нахильницкая З. Н., Влияние ионизирующих излучений на нервную систему, М., 1960.
3. Лыонг Тан Чыонг, Нгуен Хыу Чань, Лыон Тан Тхань, Нгуен Тхи Тхинь, Сытинский И. А., Радиобиология, 5, 268, 1965.
4. Мусаелян С. С., Сытинский И. А., ДАН СССР, 139, 994, 1961.
5. Сотникова А. П., Сытинский И. А., Радиобиология, 3, 504, 1963.
6. Сытинский И. А., Шан Кэ-цзинь, Сб.: Нервная система, 7, 47, 1966.
7. Фишер Р. А., Статистические методы для исследования, М., 1958.
8. Шатунова Н. Ю., Сытинский И. А., Сб.: Нервная система, 3, 12, 1962.
9. Nischi H., Sudow J., Ohtsu T., Yokohama Med. Bull., 10, 129, 1959.
10. Sytinskii J. A., Priyatkina T. N., Biochem. Pharmacol., 15, 49, 1966.



## НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИАЦИИ СИМПАТИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ

М. П. Барц

Лаборатория биохимии Харьковского научно-исследовательского института  
эндокринологии и химии гормонов, Харьков

Одну из задач биохимии нервной системы составляет выяснение механизма химической медиации нервных импульсов. В течение длительного периода времени внимание исследователей было привлечено к явлению, которое отражает лишь один из моментов этого процесса — освобождению медиаторов окончаниями нервов. Вопрос о том, каким образом освободившееся при стимуляции нерва специфическое вещество включается в биохимическую динамику клеток эффекторного органа, оставался открытым.

С позиций современной биохимии механизм включения медиаторов в биохимическую динамику клеточных процессов следует понимать как их взаимодействие с определенными структурными образованиями, осуществляющими роль рецепторов нервного влияния.

Гипотетически предположение о наличии таких рецепторных образований было высказано еще в прошлом столетии (Ленгли). Но и в настоящее время их существование и природа еще почти совершенно не исследованы. А вместе с тем, приуроченность процессов к определенным субклеточным структурам в ходе развития молекулярной биологии и биофизики находит все большее подтверждение, побуждая думать о значении такого принципа и в осуществлении функции медиаторов.

Имеется достаточно оснований для предположения, что в образовании и функции структур, участвующих в механизме передачи нервных импульсов, определяющую роль играют белковые вещества. Гипотеза о значении в нервных процессах медиаторных веществ, связанных с белковыми структурами, была высказана А. М. Утевским в 1934 г. Изучению роли белковых тел в нервной регуляции посвящены исследования Х. С. Коштойнца и др. (1). В этой связи большой интерес представляют исследо-

вания и концепции Д. Нахмансона (2), посвященные изучению механизма действия ацетилхолина.

К проблеме взаимодействия медиатора со структурами, выполняющими функцию рецепции нервных влияний, приводит и другой аспект исследований механизма химической медиации — изучение тех клеточных процессов, через которые реализуется действие медиатора на функции различных органов и систем. Работами школы Кори (Сэзерлендом, Ролл и др.) показано, что ключевой реакцией, с которой начинается цепь явлений, вызываемый действием катехоламинов (КА), может быть активирование системы ферментов, названных аденилциклазами. Как было обнаружено, эти ферменты, катализирующие образование из АТФ циклического АМФ (которые участвуют в активировании гликоген-фосфорилазы) локализованы в структурированных элементах клетки. Свойства частиц, проявляющих аденилциклазную активность, позволили предположить их принадлежность к ядрам либо мембранам клеток.

Представление о взаимодействии с функциональными (рецепторными) белковыми структурами как о пути включения медиатора симпатических нервов — норадреналина (НА) в биохимическую динамику эффекторного органа было рабочей гипотезой наших исследований, начатых и проводимых в течение ряда лет под руководством проф. А. М. Утевского. В ходе этих исследований в эффекторном органе — сердце кролика — обнаружена фракция НА, связанная со структурными образованиями органа, не растворимыми в воде и растворах нейтральных солей, извлекающих сократительные белки (3, 4). Данные исследований показали, что связанный НА локализован в частицах гомогената сердца, выделяемых из измельченной ткани путем отмывки водой с центрифугированием при низкой гравитационной силе (2,5 тыс. об/мин). Обнаружилось, что освобождение связанного НА имеет место при кислотной либо тепловой денатурации белка. Это привело к предположению о белковой природе веществ, с которыми комплексована выявленная фракция НА. Подтверждение этого предположения получено в результате изучения белковых экстрактов из гомогенатов сердца. Связанный НА удается экстрагировать из измельченной ткани вместе с фракцией белков, названных Сент-Дьердьи «структурными II» белками (обработка 30% щелочным раствором мочевины при нагревании до 60°С). Для стабилизации НА нами использован антиоксиген — аскорбиновая кислота. При исследовании УФ-спектров щелочно-мочевинных экстрактов из сердца отмечена прямая зависимость между оптической плотностью при 290 мкмк и содержанием в экстракте НА.

Обнаружилось, что после обработки ткани с разрушенными клетками 8% раствором хлористого калия часть связанного НА может быть извлечена боратым буферным раствором (рН

7,8—8,6). Выявлена обратная зависимость между оптической плотностью такого экстракта, отнесенной к мг содержащегося в нем белка, и концентрацией НА (рис. 1). Эта депрессия поглощения УФ света при 260 мкм (максимум экстракта) выражена лучше, чем при 285 мкм (максимум НА). В ряде случаев

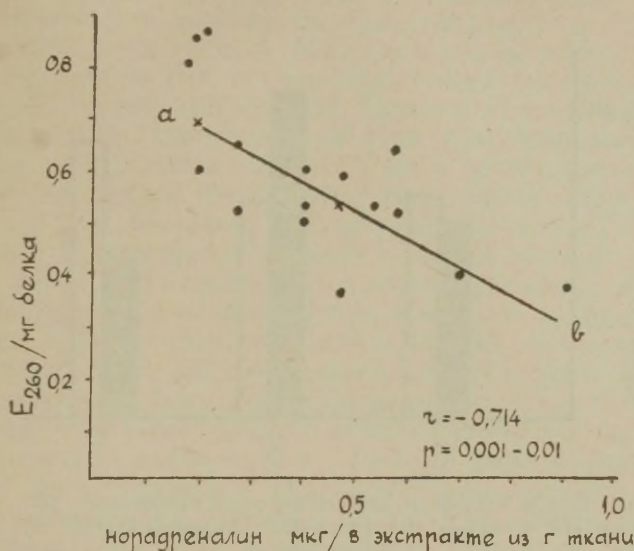


Рис. 1. Зависимость между оптической плотностью белков боратных экстрактов из сердца и концентраций НА.

депрессия оптической плотности наблюдалась при инкубации экстракта с добавлением d, l — норадреналина *in vitro*. Результаты спектрофотометрического исследования свидетельствуют о взаимодействии НА с экстрагированными из сердца белками, о наличии в сердце белковых комплексов медиатора, о его протеидизации.

В ряде исследований нами решался вопрос о функциональном значении обнаруженных в сердце белковых комплексов НА. С этой целью исследована зависимость между протеидизацией НА и симпатикотропным возбуждением органа. Результаты этих исследований показали следующее. При раздражении шейного симпатического нерва электрическим током (*in situ*, в целостном организме) вместе с усилением сокращений сердца наблюдалось повышение в нем уровня протеидизации НА.

После хронического раздражения верхних шейных ганглиев отмечена тенденция к снижению в сердце содержания связанного белком медиатора. Его уменьшение обнаружено при изменении в состоянии нервной системы, обусловленном кастрацией.



В опытах на изолированном сердце кролика на высоте функционального эффекта медиатора (усиление сокращений в ответ на его введение) наблюдалось повышение уровня протеидизации НА, который не отличался от контроля в период возврата амплитуды сокращений органа к исходным величинам (рис. 2).

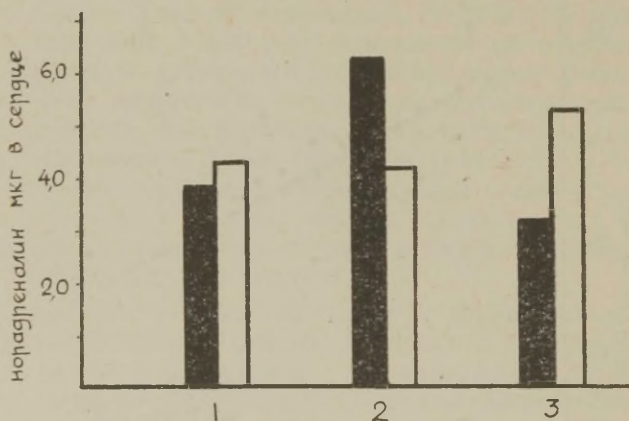


Рис. 2. Свободный и связанный нерастворенными белками НА в сердце при различных функциональных состояниях органа.

■ связанный НА, □ свободный НА. 1 — перфузия без введений; 2 — на высоте эффекта введенного НА; 3 — при возврате к исходной амплитуде.

При различных симпатикотропных воздействиях (введение адреналина, НА, никотина) обнаружилась одинаковая закономерность: сопряженность функционального действия медиатора (его влияние на силу сокращений сердца) со сдвигом в сторону большего уровня протеидизации НА. Относительное содержание фракции свободного медиатора обычно при этом уменьшалось.

Таким образом, результаты изучения зависимости между протеидизацией НА и симпатикотропной стимуляцией сердца свидетельствовали в пользу предположения о том, что обнаруженное нами комплексообразование НА с белковыми структурами сердца отражает путь включения медиатора в процессы, через которые осуществляется его влияние на функциональное состояние сердца. Для того, чтобы убедиться в этом, мы провели параллельное исследование в сердце концентрации протеидизированного НА и активности фермента фосфоорилазы  $\alpha$ , с образованием которого, как указано выше, ряд авторов (Сэзерленд и др.) связывают механизм действия КА. Результаты исследования показали, что в сердце существует прямая зависимость

между активностью фосфорилазы  $\alpha$  и концентрацией прочно связанного с белком НА. Эти данные подтвердили предположение о том, что выявляемая нами протеидизация НА служит выражением взаимодействия медиатора с функциональными (ад-ренорецепторными) структурами сердца. Обращает на себя внимание сходство ряда особенностей, отмеченных при изучении протеидизации НА с описанными Сэзерлендом и др. (5) свойствами аденилциклаз. Так, и обнаруживаемые нами в сердце белковые комплексы НА, и аденилциклазная активность локализованы в наименее растворимой фракции гомогенатов, выделяемой при низкой гравитационной силе. Гипотоническая среда не приводит ни к освобождению НА, ни к потере ферментативной активности; как то, так и другое имеет место при обработке хлористым калием (большие концентрации), спиртом и эфиром. Исследование аденилциклаз привело к заключению об их локализации в ядрах либо мембранах клетки. Указанные особенности протеидизации НА позволили нам высказать предположение о таком же субклеточном распределении НА протеидов. Согласно Сэзерленду и др., образование циклического АМФ составляет начальный результат взаимодействия КА с рецепторами клетки, которыми служит локализованная в клеточных мембранах система аденилциклаз. Поэтому наши данные о протеидизации НА в сердце и о функциональном значении обнаруженных комплексов НА с белком побуждают думать об их непосредственном отношении к клеточным структурам, обладающим аденилциклазной активностью. Решение этого вопроса требует специального изучения.

В настоящее время, помимо наших исследований, известен ряд данных, убеждающих в правильности развиваемых нами представлений. Показано наличие в тканях КА, связанных субклеточными структурами; выявлено, что характер этих структур (тип связывания КА) различен, имеются различные их фракции (Аксельрод, Тренделенбург, Поттер). Обнаружена способность тканей к аккумуляции введенных КА. Получен ряд данных, свидетельствующих о взаимодействии КА с белками и другими компонентами клетки. И если еще недавно связывание КА структурами тканей рассматривалось лишь как механизм их временной инактивации, то теперь в литературе все чаще встречаются высказывания о взаимодействии с рецепторными образованиями как об обязательном этапе передачи нервных импульсов. В связи с этим ставится вопрос о недостаточности определения суммарного содержания КА в тканях и средах организма, подчеркивается необходимость исследования функциональной значимости различных их форм (6).

Вместе с тем, в пользу развиваемых представлений свидетельствует и другая линия проводимых нами исследований. Уже давно обращал на себя внимание частый параллелизм — совпа-



дение мест и характера действия симпатической нервной системы (адренергических веществ) с действием адренокортикоидов. Эти совпадения, а также данные об особой роли обеих систем в приспособительных реакциях организма привели нас к предположению о взаимодействии гормонов коры надпочечников и химических факторов возбуждения симпатических нервов в передаче импульсов симпатической нервной системы эффекторному органу. При этом мы руководствовались данными о существовании зависимости между этими факторами регуляции не только по линии мобилизации и синтеза, но и в процессах реализации их действия: в литературе накапливались указания на роль гормонов коры надпочечников в реакции различных эффекторных органов по отношению к симпатической нервной системе. В настоящее время представление о «пермиссивном» значении кортикостероидов для эффективности адренергических влияний нашло широкое признание.

Гипотеза о роли в медиации возбуждения симпатических нервов комплексирования медиатора с функциональными белковыми структурами эффекторного органа позволяла думать, что значение адренокортикоидов для эффективности действия симпатических нервов включает в себя их участие в протеидизации НА. В пользу этого предположения говорят данные ряда проведенных нами исследований.

На целостном организме животного (кролика) показано, что введение ДОКА влияет на протеидизацию НА в сердце и изменяет способность ткани органа к связыванию медиатора *in vitro*. В оптимальных условиях воздействия введение ДОКА оказывало на протеидизацию медиатора положительное влияние. В аналогичных опытах повышение в сердце связывания НА с белком наблюдалось после введения АКТГ. Данные о таком действии АКТГ подтверждены исследованиями Э. И. Верещаковой, А. С. Ручкиной.

Влияние ДОКА на протеидизацию НА наблюдалось и в опытах на изолированном сердце, в условиях стимуляции органа введением НА во время развития прогрессирующей гипоксии. В таких же опытах повышение уровня протеидизации медиатора отмечено при добавлении к перфузату гормона коры надпочечников — гидрокортизона, а перфузия блокатором действия адренокортикоидов — спиролактоном SC 5233 привела к уменьшению в сердце содержания прочно связанного белком НА (рис. 3). Повышение содержания в сердце протеидизированного НА наблюдалось и при введении кортизона (исследование Э. И. Верещаковой, опыты с введением гормона крысам).

Таким образом, данные ряда исследований показали, что как в целостном организме животного, так и в изолированном органе (сердце) адренокортикоиды могут оказывать положительное влияние на образование белковых комплексов НА. В силу того,



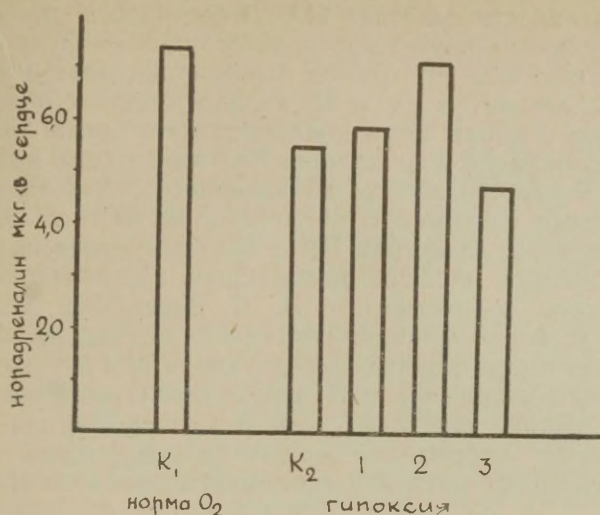


Рис. 3. Содержание норадреналина в отмытом гомогенате возбужденного сердца кролика.

K<sub>1</sub> — контроль; K<sub>2</sub> — контроль; 1 — альдактон; 2 — гидрокортизон; 3 — SC 5233.

что наличие кортикостероидов является необходимым условием проявления симпатических воздействий («пермиссивное» значение гормонов коры надпочечников для эффективности действия симпатических нервов), их влияние на протеидизацию медиатора НА подтверждает наше представление о функциональном значении обнаруженных в сердце комплексов НА с белком (7, 8).

Но если адренокортикоиды имеют отношение к взаимодействию НА с белковыми структурами, то в чем может состоять механизм такого их влияния? В настоящее время кажется достаточно обоснованной точка зрения, согласно которой общим звеном, определяющим различные эффекты гормонов коры надпочечников, может быть их значение в регуляции клеточного градиента электролитов натрия и калия. Возник вопрос о том, не с этим ли значением кортикостероидов связана их роль в функциональной протеидизации НА?

Известно, что градиент электролитов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> составляет существенный фактор процесса возбуждения клетки. Поэтому естественно было думать, что механизм действия симпатических нервов не может не иметь отношения к процессам, поддерживающим неравномерное распределение ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в клетке и окружающей ее среде. В литературе имеются сообщения о влиянии КА на содержание в тканях Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> и о значении Na<sup>+</sup>

для эффективности действия НА. В силу этого, предположение о сопряженности влияния кортикостероидов на функциональную протеидизацию НА с их ролью в регуляции клеточного распределения электролитов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  казалось вполне обоснованным. Получен ряд данных, подтверждающих это предположение. Показано, что наличие в среде иона  $\text{Na}^+$  необходимо для того, чтобы имело место связывание добавленного НА белками ткани с разрушенными клетками и обработанной  $\text{KCl}$  (*in vitro*). Роль натрия для взаимодействия НА с белками отмечена при изучении УФ-спектров щелочно-мочевинных экстрактов из сердца.

Результаты совместного с Э. Л. Верещавой исследования обнаружили, что во фракции гомогената сердца, выделяемой путем отмывки водой с центрифугированием при 2,5 тыс. оборотов, концентрация натрия больше, чем калия. Относительное (к калию) содержание его выше, чем в кашице сердца. Выявлена положительная корреляция между концентрацией в отмытом гомогенате сердца натрия и протеидизированного НА (рис. 4).

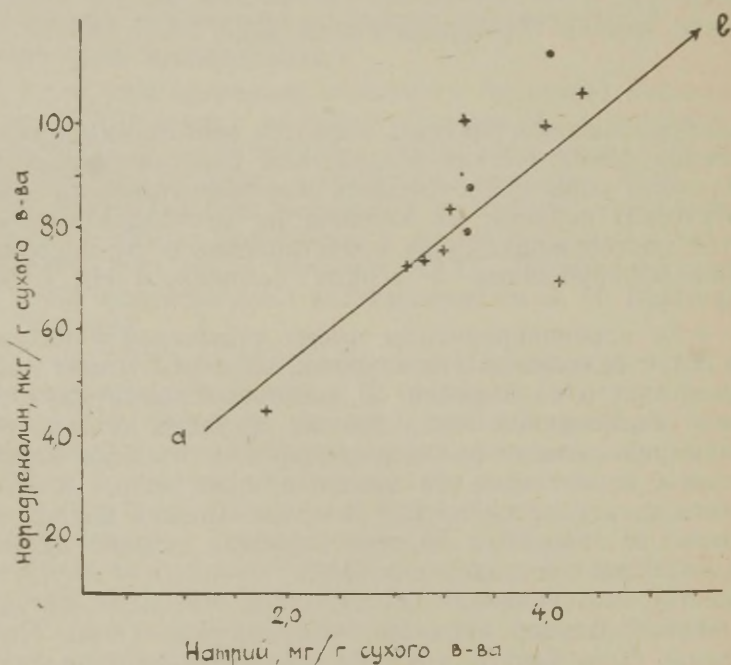


Рис. 4. Зависимость между содержанием натрия и норадреналина в отмытом гомогенате сердца кролика. (Изолированное сердце кролика, перфузия с обычной оксигенацией).

● — без стимуляции; + — стимуляция норадреналином.

На высоте положительного инотропного эффекта введения НА содержание калия в изолированном сердце было ниже, чем без такой стимуляции; отношение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  при возбуждении сдвигалось в сторону увеличения.

Обнаружено уменьшение содержания в отмытом гомогенате  $\text{Na}^+$  и связанного белком НА, а также менее закономерное проявление зависимости между этими показателями после возбуждения сердца введением НА во время прогрессирующей гипоксии. При этом выявлена отрицательная корреляция между величиной отношения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  и концентрацией протеидизированного НА.

При перфузии гидрокортизоном отмечено выравнивание показателей, измененных в результате гипоксии: в отмытом гомогенате обнаружено большее содержание  $\text{Na}^+$ , чем при стимуляции в условиях гипоксии во время перфузии контрольным раствором; увеличивались отношение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  и концентрация протеидизированного НА, наблюдалось закономерное проявление прямой зависимости между концентрацией  $\text{Na}^+$  и связанного белком НА; выявлена положительная корреляция между уровнем протеидизированного медиатора и величиной отношения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . При стимуляции сердца введением НА в условиях прогрессирующей гипоксии во время перфузии блокатором действия кортикостероидов — спиролактоном SC 5233 зависимость между уровнем  $\text{Na}^+$  и НА была нарушена. Данные исследований свидетельствуют о значении иона  $\text{Na}^+$  для взаимодействия медиатора НА с функциональными адренорецепторными белками сердца.

Вместе с тем, эти данные подтверждают предположение о роли гормонов коры надпочечников в протеидизации НА, указывая на то, что механизм такого значения адренокортикоидов сопряжен с их ролью в регуляции клеточного градиента электролитов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Это заключение согласуется с результатами исследований Сент-Дьердьи и сотр., показавших, что кортикостероиды и КА действуют на мышцы, изменяя проницаемость клеточных мембран для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (9).

Предположение об отношении электролитов к значению кортикостероидов для действия КА высказали Рамми и Гольдштейн (10). К выводу о существовании функциональных взаимоотношений между гормонами мозговой и корковой частей надпочечника, осуществляющихся через действие кортикостероидов на концентрацию Na в стенке артериол, приходит Росс (11).

В свете современных представлений о конформационных изменениях белковых молекул, возникающих в результате аллостерических взаимодействий с различными факторами регуляции, возникает предположение, что участие кортикостероидов в образовании комплексов медиатора НА с адренорецепторными структурами может быть тем путем, с помощью которого их влияние



на распределение электролитов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  трансформируется в множественные эффекты в различных функциональных системах и процессах обмена веществ.

Приведенные данные и представления свидетельствуют о том, что в сердце кролика нами обнаружено взаимодействие медиатора НА с клеточными структурами, которые, по-видимому, выполняют функцию рецепции адренергических влияний. Вместе с тем, рассмотренный аспект, указывая на возможное отношение функциональных комплексов медиатора НА к регуляции биохимических процессов, ассоциированных с клеточными мембранами, побуждает к поиску адренорецепторных структурных образований в мембранах клеток.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Коштыяц Х. С., Белковые тела, обмен веществ и нервная регуляция, М., 1951.
2. Нахмансон Д., В кн.: Молекулярная биология, М., 282, 1964.
3. Барц М. П., Биохимия, 22, 677, 1957.
4. Барц М. П., Биохимия, 30, 922, 1965.
5. Sutherland E. W., Wosilait W. D., J. Biol. Chem., 218, 459, 1956.
6. Trendelenburg U., Pharm. Rev., 1963.
7. Ingl D. J., Pediatrie, 17, 407, 1956.
8. Барц М. П., Труды УИЭЭ, 18, 210, 1961.
9. Hajdu S., Szent-Györgyi A., Am. J. Physiol., 168, 159, 1952.
10. Ramey E. R., Goldstein M. S., Physiol. Rev., 37, 155, 1957.
11. Ross E. J., Quart. J. Med., 30, 285, 1961.

# ДЕЙСТВИЕ ПСИХОТРОПНЫХ СРЕДСТВ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

---

## БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ РЕФЛЕКТОРНОМ И ЦЕНТРАЛЬНОМ ДЕЙСТВИИ АМИЗИЛА И ЦЕНТРОФЕНОКСИНА

С. И. Балув

Институт биохимии АН Укр. ССР, Киев

За последние годы психофармакология обогатилась большим количеством фактов, объяснение которых наталкивается на значительные трудности.

Накопились данные, свидетельствующие о том, что нейротропные средства с одинаковой направленностью действия на функциональное состояние организма (успокаивающие или стимулирующие ЦНС), могут изменять биохимические процессы в головном мозгу в противоположном направлении, а препараты, влияющие противоположным образом (успокаивающие и стимулирующие ЦНС), могут вызывать близкие, если не одинаковые биохимические изменения в нервной ткани. Так, хорошо известно, что резерпин снижает (1), а люминал (фенобарбитал) значительно повышает уровень серотонина в головном мозгу (2, 3), хотя оба препарата оказывают выраженное седативное действие. Наркотики — эфир (4), барбитураты (5), увеличивают содержание серотонина в нервной ткани, также как и ингибиторы МАО, оказывающие антицидепрессивное действие (6). Уровень норадреналина (НА) в мозгу снижается как под влиянием стимулятора нервной системы фенамина (7), так и успокаивающего средства резерпина (8). Можно было бы привести еще немало подобных фактов.

Исследуя влияние нейротропных средств на обмен веществ в головном мозгу и на его функциональное состояние, мы также получили данные, свидетельствующие о том, что противоположно действующие вещества — успокаивающие и стимулирующие

деятельность ЦНС, могут вызывать в ней сходные биохимические изменения.

Так, транквилизатор амизил (бенактизин), при внутривенном введении intactным собакам в дозе 15 мг/кг веса, вызывал, одновременно с успокаивающим эффектом, значительное, статистически достоверное повышение содержания в головном мозгу не только серотонина, как это отметил Н. Т. Старых (9), но также норадреналина (НА) и азота аммиака. Следовательно, амизил нельзя рассматривать только как центральный холинолитик, как это принято считать (10), а необходимо при объяснении его механизма действия учитывать и влияние, оказываемое им на обмен биогенных аминов и азотистых соединений в нервной ткани.

Оказалось, что приблизительно такие же биохимические изменения в головном мозгу, а именно, повышение содержания в нем серотонина, НА и азота аммиака вызывает антидепрессивное и стимулирующее средство центрофеноксин (люцидрил), при внутривенном введении которого intactным собакам в дозе 50 мг/кг веса наступало выраженное возбуждение ЦНС, т. е. состояние, противоположное успокаивающему эффекту транквилизатора амизила. Влияние эфира в наркотических дозах на те же стороны обмена веществ в нервной ткани мало чем отличается от действия на них амизила и центрофеноксина.

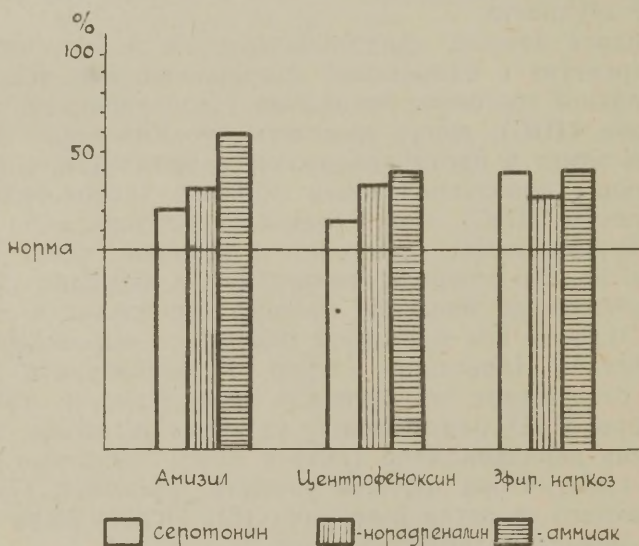


Рис. 1. Изменения в процентах по отношению к норме содержания в головном мозгу intactных собак серотонина, норадреналина и азота аммиака под влиянием амизила, центрофеноксина и эфирного наркоза.



Эти данные, подробное изложение которых служит предметом отдельных сообщений, иллюстрированы рисунком 1, на котором представлены средние (из 8 опытов в каждой серии) изменения в процентах по сравнению с нормой содержания в мозговой ткани собак серотонина, НА и азота аммиака под влиянием транквилизатора амизила, стимулятора ЦНС центрофеноксина и эфирного наркоза. Эти препараты вызывают соответственно повышение содержания в нервной ткани серотонина (норма — 0,20 мкг на 1 г свежей ткани) на 20, 15 и 40%; НА (норма — 0,30 мкг/г) — на 30, 34 и 26%; и азота аммиака (норма — 0,43 мг%) — на 60, 35 и 35%.

Как видно, эти биохимические изменения мало отличаются друг от друга, а в отдельных случаях они были идентичными, так что по ним невозможно определить, какие из них вызваны стимулятором, транквилизатором или наркотиком.

Получается в этом случае, как и в приведенных из литературы примерах, что в основе различных и даже противоположных функциональных состояний ЦНС, вызванных разными нейротропными средствами, могут лежать близкие, если не одинаковые процессы обмена веществ. Так ли это в действительности?

Ведь эти факты как будто противоречат неоспоримому положению о том, что в основе функциональной деятельности лежат процессы обмена веществ. Как же разрешаются эти противоречия?

К решению этого вопроса позволили подойти поставленные нами опыты, в которых исследовалось раздельно центральное и рефлекторное действие нейротропных средств, то есть их прямое действие только на головной мозг или только на периферические органы и ткани.

### Методика

В этих опытах использовалась разработанная нами методика изоляции в гуморальном отношении головы собаки при полном сохранении ее нервных связей с туловищем (11). В условиях перекрестного кровообращения между двумя собаками, оперированными таким образом (под наркозом хлоралозой, 60—100 мг/кг), голова каждой из них получала через сонные и позвоночные артерии кровь только из туловища другой собаки (рис. 2). Таким образом, изучаемый препарат, введенный внутривенно в туловище первой собаки (А), не проникал в ее голову, но оказывал прямое действие на головной мозг второй собаки (Б), в туловище которой он не попадал. У первой собаки наблюдались только рефлекторно вызванные изменения состояния головного мозга, у второй собаки только прямое действие препарата на нервные центры. У этой последней производилось выключение обоих каротидных синусов по предложенной нами методике, суть которой состоит в том, что через общую сонную артерию во внутреннюю сонную артерию вводится пластмассовая канюля, через которую кровь поступает из туловища первой собаки в голову второй, минуя синокаротидную рефлексогенную зону, так что исключается ее влияние на головной мозг.

Через 3 минуты после внутривенного введения амизила (15 мг/кг) или центрофеноксина (50 мг/кг) в туловище первой собаки, головы животных

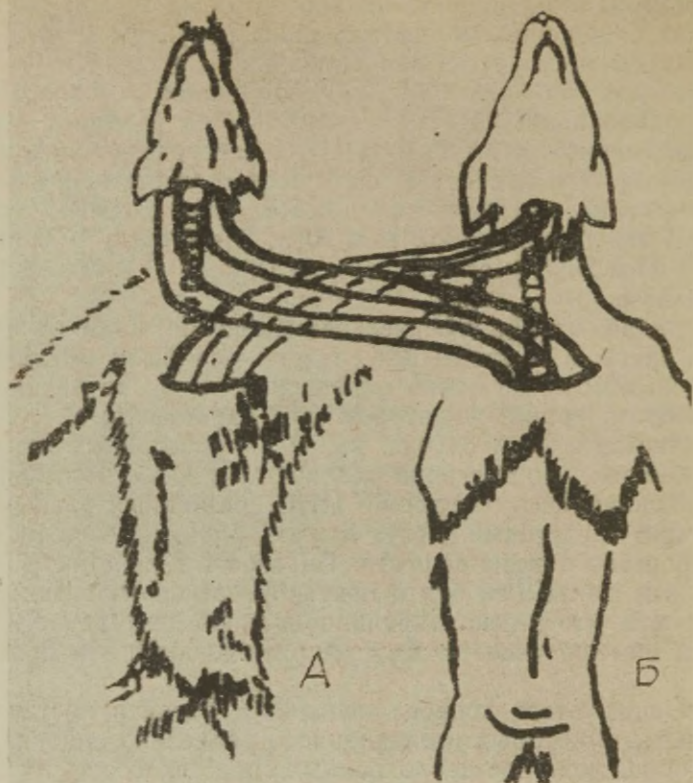


Рис. 2. Схема опыта с перекрестным кровообращением.

замораживались *in vivo* жидким азотом по способу, разработанному в нашей лаборатории. Так как собака продолжала дышать в течение всего процесса замораживания, то исключалась гипоксия и вызываемые ею нарушения обмена веществ в нервной ткани. Регистрация показателей функционального состояния центральной нервной системы и всего организма (ЭЭГ, ЭКГ, кровяное давление, дыхание и т. д.) проводилась вплоть до полного замораживания головного мозга. Электроэнцефалограмма (биполярное отведение) записывалась с 4 электродов (расстояние между ними 2—3 мм), вживленных за 7—10 дней до опыта в диэнцефальную область ретикулярной формации. Регистровалось второе стандартное отведение ЭКГ.

В головном мозгу (без мозжечка) определялось содержание НА по методике В. О. Осинской (12), серотонина — по методике Д. Ф. Богданского и соавторов (13), и азота аммиака — по методике Р. Х. Брауна и соавторов (14) в модификации А. И. Силаковой с соавторами (15).

В 8 контрольных опытах определяли те же функциональные и биохимические показатели у собак, которым производили оперативное вмешательство под хлоралозовым наркозом, но вместо изучаемого препарата внутривенно вводили физиологический раствор.

Полученные результаты подвергались статистической обработке.



## Результаты исследований и их обсуждение

Контрольные опыты показали, что у собак, которым производили оперативное вмешательство под хлоралозовым наркозом, но вместо изучаемого препарата внутривенно вводили физиологический раствор, содержание в головном мозгу серотонина (0,20 мкг/г), НА (0,28 мкг/г) и азота аммиака (0,57 мг%) существенно не отличалось от того, что наблюдается у собак в норме.

Различия между контролем и нормой статистически не достоверны.

В наших условиях опыта, при внутривенном введении ами-

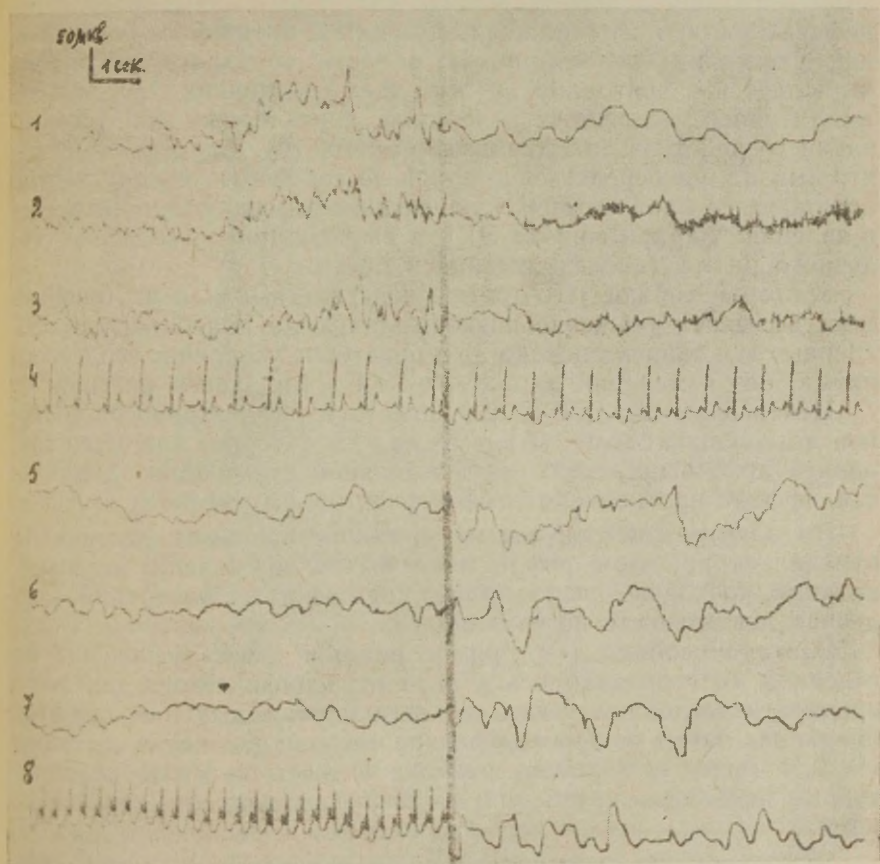


Рис. 3. Изменения ЭЭГ и ЭКГ при центральном и рефлекторном действии амизила.

1, 2, 3 — ЭЭГ и 4 — ЭКГ второй собаки (Б); 5, 6, 7 — ЭЭГ и 8 — ЭКГ первой собаки (А) до (слева) и после (справа) внутривенного введения амизила в туловище первой собаки (А).



зила (15 мк/кг) в туловище первой собаки (А), у которой препарат действовал на головной мозг только рефлекторно, наблюдался специфический для транквилизатора успокаивающий эффект, что проявлялось в поведенческой реакции, на электроэнцефалограмме и в замедлении или остановке дыхания.

У второй собаки (Б) амизил оказывал прямое действие на головной мозг, что вызывало у нее неспецифический раздражающий эффект и учащение дыхания.

На рисунке 3 представлены электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и электрокардиограммы (ЭКГ) первой собаки (нижняя половина рисунка) и второй (верхняя половина рисунка), записанные до (слева) и после (справа) внутривенного введения 15 мг/кг амизила в туловище первой собаки (А). Амизил вызывает у нее рефлекторно изменение биоэлектрической активности ретикулярной формации диэнцефальной области головного мозга, что выражается в появлении на всех трех отведениях ЭЭГ высокоамплитудных медленных колебаний, характерных для успокаивающего действия транквилизатора (10, 16). Следует отметить, что амизил, непосредственно влияя на сердечную мышцу, сильно нарушает ее биоэлектрическую активность, что обнаруживается в явлениях параритмии на ЭКГ и выраженном замедлении сердечного ритма (последняя запись рисунка).

У второй собаки (Б) прямое действие амизила на головной мозг вызывает учащение низкоамплитудных колебаний на ЭЭГ (первые три записи рисунка 3) и некоторое ускорение сердечного ритма, без изменений характера ЭКГ (4-я запись рисунка 3).

Центрофеноксин (50 мг/кг), действуя рефлекторно на головной мозг первой собаки (А), вызывал характерное для этого препарата ярко выраженное возбуждение и стимуляцию дыхания, т. е. эффект, противоположный рефлекторному эффекту амизила.

На электроэнцефалограмме (нижняя половина рисунка 4) отмечалось при этом рефлекторно вызванное явление десинхронизации, появление низкоамплитудных быстрых колебаний. Сердечная деятельность не изменялась.

У второй собаки (Б) прямое влияние центрофеноксина на головной мозг проявлялось в виде неспецифического для этого препарата состояния угнетения и задержки дыхания, которые сменялись затем явлениями раздражения и учащения дыхания. На ЭЭГ (верхняя половина рисунка 4) выступали высокоамплитудные медленные колебания, на ЭКГ — замедление сердечного ритма.

Можно отметить противоположную направленность эффектов, вызванных центральным и рефлекторным действием каждого препарата.

Биохимические исследования мозговой ткани показали (рисунк 5), что транквилизатор амизил вызывает рефлекторно (у 1-й собаки) статистически достоверное увеличение содержания

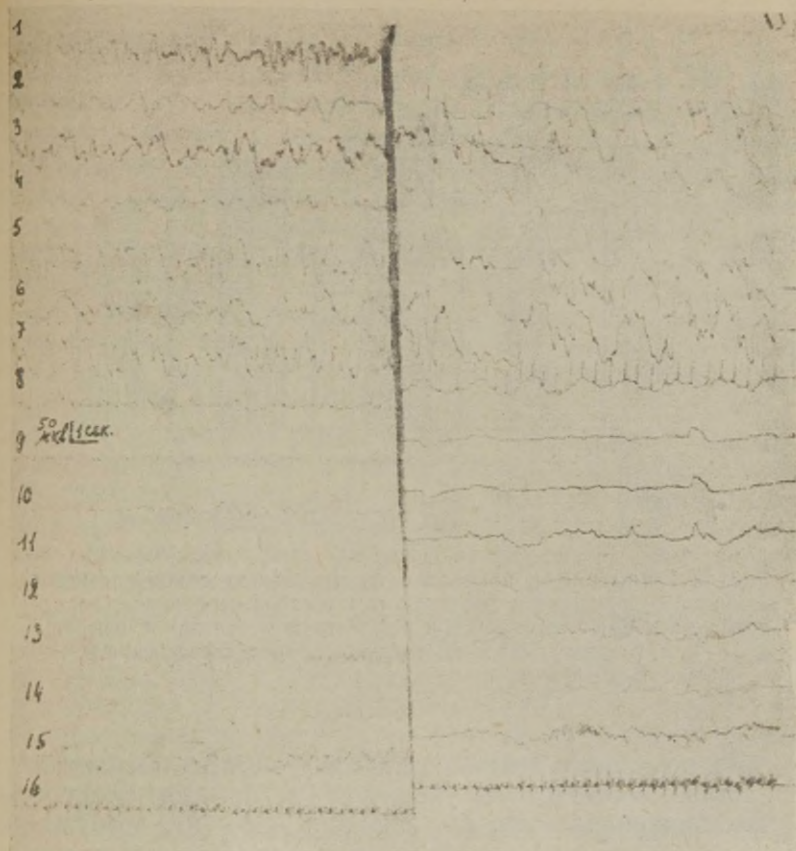


Рис. 4. Изменения ЭЭГ и ЭКГ при центральном и рефлекторном действии центрофеноксина.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 — ЭЭГ и 8 — ЭКГ второй собаки (Б); 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 — ЭЭГ и 16 — ЭКГ первой собаки (А) до (слева) и после (справа) внутривенного введения центрофеноксина в туловище первой собаки (А).

в головном мозгу серотонина; несколько повышается содержание НА, но оно статистически не достоверно; уровень аммиака не изменяется.

Стимулятор центрофеноксин вызывает рефлекторно (у 1-й собаки) значительное, статистически достоверное увеличение содержания в головном мозгу НА и небольшое, статистически недостоверное повышение уровня серотонина и азота аммиака.

Как видно, транквилизирующему действию амизила, вызванному им рефлекторно, соответствует умеренное увеличение в головном мозгу уровня серотонина, что сопровождается, как известно (17), успокоением нервной деятельности.

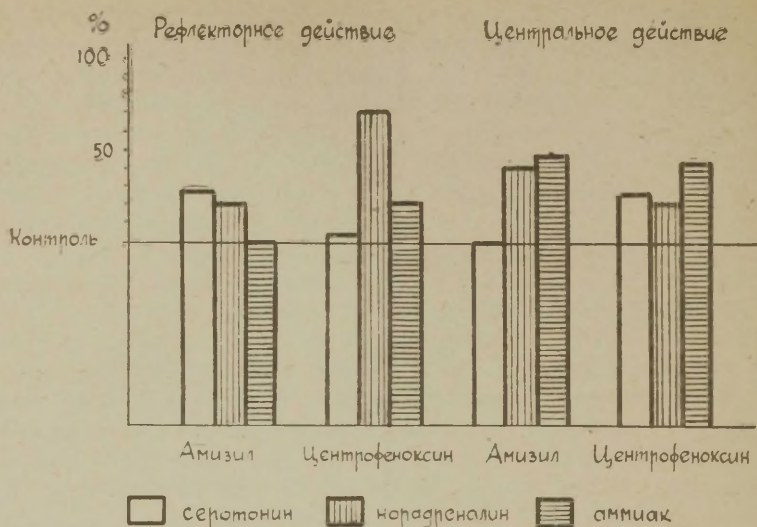


Рис. 5. Изменения в процентах по сравнению с контрольными данными содержания в головном мозгу собак серотонина, норадреналина и азота аммиака при рефлекторном (слева) и центральном (справа) действии амизила и центрофеноксина.

Стимулирующему действию центрофеноксина, вызванному им рефлекторно, соответствует увеличение в головном мозгу уровня НА, что сопровождается, как известно (18, 19), возбуждением ЦНС.

Таким образом, двум отличающимся друг от друга функциональным состояниям ЦНС — успокоению и возбуждению ее деятельности, соответствуют также различные, строго определенные биохимические изменения в головном мозгу. Успокоение сопровождается повышением содержания серотонина в нервной ткани, возбуждение — НА.

Особого внимания заслуживает тот факт, что эти биохимические изменения, как и соответствующие им функциональные состояния ЦНС, вызваны рефлекторно. Специфический эффект нейротропных препаратов амизила и центрофеноксина проявляется, как видно, особенно четко при рефлекторном их действии.

Прямое их действие на головной мозг вызывает в отношении функционального состояния, как мы уже отмечали, неспецифический раздражающий эффект. При этом как под влиянием амизила, так и центрофеноксина, статистически достоверно повышается в головном мозгу уровень азота аммиака, что мы склонны рассматривать как проявление прямого токсического действия



препаратов на нервную ткань. Амизил, при центральном действии, увеличивает и содержание НА в головном мозгу, а центрофеноксин несколько повышает уровень серотонина и НА, но эти изменения не являются статистически достоверными.

Интересно отметить, что если амизил при рефлекторном действии вызывает относительно большее увеличение содержания в головном мозгу серотонина, чем НА, что сопровождается успокоением нервной деятельности, то при центральном действии препарата создаются обратные соотношения: значительно больше повышается уровень НА, а серотонина — не изменяется, чему соответствует раздражающий эффект. Центрофеноксин тоже по-разному влияет на биохимические процессы в нервной ткани и на ее функциональное состояние при рефлекторном и при центральном действии.

Эта противоположная направленность реакций, вызванных рефлекторным (влиянием на периферию) и центральным действием фармакологического вещества, является, по-видимому, важным фактором восстановления нарушенного химическим раздражителем равновесия (20), сохранения относительного постоянства внутренней среды организма.

У интактных животных проявляются, естественно, как рефлекторно, так и центрально вызванные реакции, т. е. результирующий из них эффект. Так, изменения содержания в головном мозгу серотонина, НА и аммиака занимают у них промежуточное положение между изменениями этих показателей, вызванных рефлекторным или прямым влиянием на головной мозг амизила или центрофеноксина.

Таким образом, у интактных животных получается смешанная картина биохимических сдвигов, которая может замаскировать изменения обмена веществ, характерные для специфического действия нейротропного препарата.

По-видимому, этим и объясняется, что разные нейротропные средства могут вызывать совершенно различные функциональные состояния ЦНС и, в то же время, казалось бы близкие, если не одинаковые биохимические изменения в нервной ткани.

Наши данные показывают, вместе с тем, что ведущая и определяющая роль в механизме действия нейротропного препарата принадлежит вызванной им рефлекторной реакции. Именно при рефлекторном действии наблюдается специфический эффект и соответствующие ему биохимические изменения в головном мозгу.

Таким образом можно объяснить упомянутые выше противоречия, которые все чаще встречаются в литературе по психофармакологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hess S. M., Shore P. A., Brodie B. B., J. Pharm. Exp. Ther., 118, 84, 1956.
2. Bonnycastle D. D., Giarman N. J., Paasonen M. K., Brit. J. Pharmacol., 12, 228, 1957.
3. Giarman N. J., Fed. Proc., 20, 897, 1961.
4. Anderson E. G., Bonnycastle D. D., J. Pharm. Exp. Ther., 130, 138, 1960.
5. Bonnycastle D. D., Bonnycastle M. F., Anderson E. G., J. Pharm. Exp. Ther., 135, 17, 1962.
6. Zeller E. A., Barsky J., Berman E. R., J. Biol. Chem., 214, 267, 1955.
7. Moore K. E., Lariviere E. W., Biochem. Pharmacol., 13, 7, 1098, 1964.
8. Shore P. A., Olin J. S., Brodie B. B., Fed. Proc., 16, 335, 1957.
9. Старых Н. Т., Бюлл. exper. биол. мед., 10, 76, 1962.
10. Денисенко П. П., Центральные холинолитики. Медицина. Л., 1965.
11. Балувев С. И., Фізіологічний журнал, 4, 6, 821, 1958.
12. Осинская В. О., Биохимия, 22, 3, 537, 1957.
13. Bogdanski D. F., Pletscher A., Brodie B. B., Udenfriend S., J. Pharm. Exp. Ther., 117, 82, 1956.
14. Brown R. H., Duda C. D., Korkes S., Handler Ph., Arch. Biochem. Biophys., 66, 30, 1957.
15. Силакова А. И., Труш Г. П., Явимакова А., Вopr. мед. химии, 8, 538, 1961.
16. Ильюченко Р. Ю., Нейро-гуморальные механизмы ретикулярной формации ствола мозга. Наука, М., 1965.
17. Brune G. G. et al., Science, 133, 190, 1961.
18. Bonvallet M., Dell R., Hugelin A., J. Physiol., 46, 262, 1954.
19. Brodie B. B., Spector S., Shore P., Pharmacol. Rev., 11, 548, 1959.
20. Балувев С. И., Фізіологічний журнал, 3, 3, 62, 1957.

## СОДЕРЖАНИЕ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ, СЕРДЦЕ И НАДПОЧЕЧНИКАХ КАТЕХОЛАМИНОВ И ИХ ЭКСКРЕЦИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ РЕЗЕРПИНА И ИМИПРАМИНА

А. М. Бару

Лаборатория биохимии Харьковского научно-исследовательского института  
неврологии и психиатрии, Харьков

Биохимический аспект функционирования центральных нервных механизмов в норме и патологии, актуальные проблемы биохимической фармакологии психотропных средств неразрывно переплетаются с изучением различных сторон обмена биологически активных веществ и соединений и, в частности, гормонов-медиаторов симпатико-адреналовой системы — катехоламинов (КА). Исследование обмена КА представляет особый интерес при нарушениях эмоциональной сферы и поведения, тесно связанных с состоянием симпатико-адреналиновой системы (1—5).

Ранее нами была получена катехоламинавая характеристика нарушений эмоциональной сферы и показано, что в этой характеристике значительное место занимают изменения соотношения между адреналином (А) и норадреналином (НА), свидетельствующие о том, что при различных эмоциональных реакциях и состояниях симпатико-адреналовая система чаще всего реагирует не как единое целое, а что имеет место преимущественное, избирательное или даже противоположно направленное изменение активности ее гормонального и медиаторного компонентов (6, 7). Этот вывод был сделан на основании исследования особенностей экскреции КА при таких полярных состояниях эмоциональной сферы, как состояние депрессии и мании при маниакально-депрессивном психозе, аффекты злости и страха при шизофрении. В дальнейшем было показано, что динамика применения ряда психотропных средств также в первую очередь характеризуется изменением соотношения между А и НА. Избирательное увеличение экскреции НА при маниакальной фазе маниакально-депрессивного психоза оказалось настолько закономерным и характерным именно для этого



заболевания, что позволило нам предложить исследование КА в качестве биохимического теста для дифференциальной диагностики маниакальных состояний различного генеза.

В плане изучения возможных механизмов обнаруженных изменений и, в частности, наблюдавшейся диссоциации в экскреции А и НА проведены экспериментальные исследования по моделированию при помощи психотропных средств различных форм нарушения эмоционального поведения. В этих исследованиях представлялось возможным сопоставить особенности экскреции КА (как доступного в клинических исследованиях объективного показателя функционального состояния симпатико-адреналовой системы) с тканевыми ресурсами КА, прежде всего, с содержанием этих веществ в головном мозгу и надпочечниках; определение КА проводилось также в сердце — эффекторном органе, богатом адренергическими структурами. Экскреция А на НА исследовалась при помощи разработанной нами методики (8), позволяющей применить при определении КА в моче основные этапы тригидроксииндолового метода В. О. Осинской (9). Содержание КА в тканях определялось по методу Осинской с некоторыми нашими изменениями. Флюорометрическое определение проводилось на флюорометре конструкции Ю. Г. Холодного при первичном интерференционном светофилт্রে с максимумом пропускания 410 мкм и вторичном — 538 мкм.

В результате проведенных исследований было показано, что при хроническом введении веществ с противоположным влиянием на состояние эмоциональной сферы наблюдаются противоположного характера изменения в экскреции КА у белых крыс. При подкожном введении депрессанта — резерпина (препарат «Рауседил» 0,5 мг/кг, ежедневно, в течение 5—7 дней) значительно уменьшалась экскреция НА и резко увеличивалось выделение А. Применение подкожно антидепрессанта имипрамина (препарат «Мелипрамин» — 12,5 мг/кг, ежедневно, в течение 7—28 дней) сопровождалось избирательным увеличением экскреции НА.

Таким образом, в эксперименте были воспроизведены особенности экскреции КА, отмеченные нами ранее при нарушениях эмоциональной сферы у больных маниакально-депрессивным психозом, причем при введении резерпина эти изменения по своему характеру приближались к наблюдавшимся при депрессивных состояниях, особенно при ажитированной депрессии, при введении имипрамина — к обнаруженным при состоянии маниакального возбуждения.

При определении КА в тканях животных, получавших имипрамин, закономерных изменений в содержании НА в головном мозгу и сердце обнаружено не было и только в надпочечниках увеличивалось количество А. При хроническом введении резерпина резко падало содержание НА в головном мозгу и сердце

(вплоть до полного «неопределения»), вместе с тем содержание КА в надпочечниках практически не изменялось; значительное снижение наблюдалось только при гибели животных. Таким образом, при экспериментальной резерпиновой депрессии диссоциации изменений экскретируемых А и НА (характерном признаке аффективных нарушений у психически больных) соответствовала четкая диссоциация тканевых ресурсов КА.

Падение содержания НА в тканях и моче при введении резерпина — хорошо известный факт, объясняемый освобождающим действием резерпина на резервы НА, при этом НА освобождается интраневрально и подвергается действию МАО. Необходимо подчеркнуть, что в наших исследованиях падение содержания НА в тканях сопровождалось сразу же после введения резерпина резким снижением количества НА в моче. Следовательно, даже исключительно массивное освобождение НА, но освобождение интраневральное, не приводит к повышенной экскреции свободного НА, т. к., очевидно, он весь успевает метаболизироваться. Это дает основание считать, что обнаруживаемый в моче НА составляет не просто 3—5% от общего количества, освободившегося из тканей, а отражает в основном экстраневральное освобождение, наступающее под влиянием нервного импульса, обеспечивающее возможность взаимодействия с адренорецепторами, т. е. именно ту форму освобождения, с которой непосредственно связана медиаторная функция НА (10, 11). Возможно этим объясняется относительная стабильность небольшой по удельному весу фракции неизмененного НА в моче при нормальных условиях и лабильность при различных воздействиях, изменяющих активность симпатико-адреналовой системы.

Наблюдавшееся при введении резерпина значительное увеличение свободного А в моче можно было также рассматривать как освобождение гормона из мозгового вещества надпочечников с последующим поступлением непосредственно в циркуляцию без взаимодействия с митохондриальной МАО (10), для которой А к тому же является значительно худшим субстратом, чем НА (12). Однако повышение экскреции А продолжалось длительный период времени, было исключительно интенсивным (10—20-кратное увеличение) и, что особенно важно подчеркнуть, — не сопровождалось падением содержания А в надпочечниках. Следовательно, повышение экскреции А обусловлено, очевидно, не просто освобождением его из запасов, а является результатом усиления как процессов выделения, так и синтеза гормона. Создавалось впечатление, что истощение запасов НА в головном мозгу, наступающее при введении резерпина, сочетается, а учитывая важную регуляторную функцию центральных адренергических структур, возможно и обуславливает повышение активности гормонального компонента симпатико-адреналовой си-



стемы. Вместе с тем не исключалась возможность, что активация мозгового вещества надпочечников обусловлена прямым, а не опосредованным через истощение тканевых ресурсов НА действием резерпина.

В плане дальнейшего изучения этого вопроса нами была применена постановка с введением резерпина на фоне угнетения МАО ипразидом. Извращающее эффект резерпина действие ингибиторов МАО (13, 14) объясняется тем, что освободившийся под влиянием резерпина НА не разрушается заблокированной МАО, а поступает обратно в места резервирования, пополняет запасы лабильно связанного медиатора и частично выделяется экстраневрально (15). В связи с этим сохраняются тканевые ресурсы моноаминов, а в поведении животных не наступает явлений седации и даже могут отмечаться признаки возбуждения. Таким образом в предпринятой постановке возникла возможность исследовать влияние хронического введения резерпина на экскрецию А, отражающую функциональное состояние мозгового вещества надпочечников, в условиях, когда истощающее действие резерпина на тканевые ресурсы НА должно было быть предотвращено.

Так же как и в предыдущих наших исследованиях, резерпин вводился белым крысам ежедневно в течение 5 дней в дозе 0,5 мг/кг. Параллельно введение резерпина в такой же дозировке было начато группе животных, предварительно получавших подкожно ипразид (100 мг/кг, через день в течение 6 дней), введение ипразиды продолжалось и в период применения резерпина. У крыс первой группы, получавших только резерпин, наблюдалась типичная картина «резерпиновой депрессии» с общим угнетением животных и рядом симптомов «фармакологической десимпатизации». У животных, предварительно получавших ипразид, введение резерпина не сопровождалось развитием депрессии, а наоборот, отмечалось увеличение спонтанной двигательной активности, наблюдались четкие признаки симпатикотонии (экзофтальм, пилоэрекция), а при помещении животных попарно — выраженная агрессивность (бойцовые позы, писк, драки).

При исследовании экскреции КА (рис. 1) у животных, получавших резерпин, наблюдалась уже отмеченная нами ранее диссоциация в содержании А и НА: резкое падение количества НА в моче сопровождалось исключительно интенсивным увеличением содержания А. В результате этих противоположно направленных изменений уже на второй день после введения резерпина наблюдался характерный перекрест показателей, отражающих динамику экскреции А на НА. Введение резерпина на фоне ипразиды не вызывало падения содержания НА и, что особенно важно подчеркнуть, при этом не происходило повы-



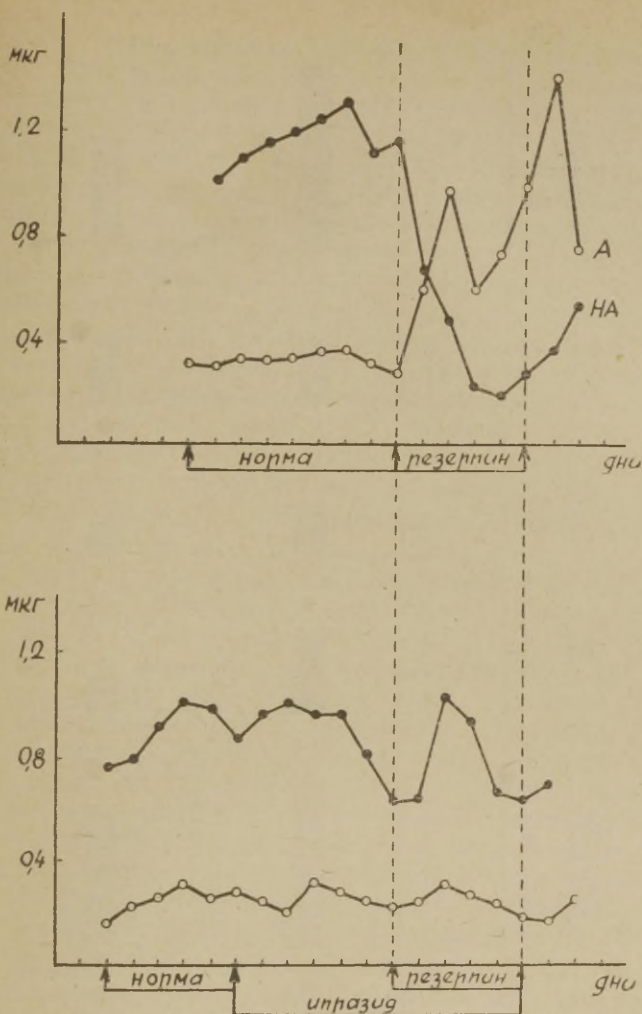


Рис. 1. Экскреция адреналина (А) и норадреналина (НА) у белых крыс при введении резерпина (верхняя часть диаграммы) и при введении резерпина на фоне ипразида.

шения экскреции А — содержание его в моче практически не изменялось.

В этих двух группах животных, а также в двух группах контрольных крыс — интактных и получавших только ипразид — исследовалось содержание КА в различных отделах головного мозга, сердце и надпочечниках (рис. 2). Особый интерес,

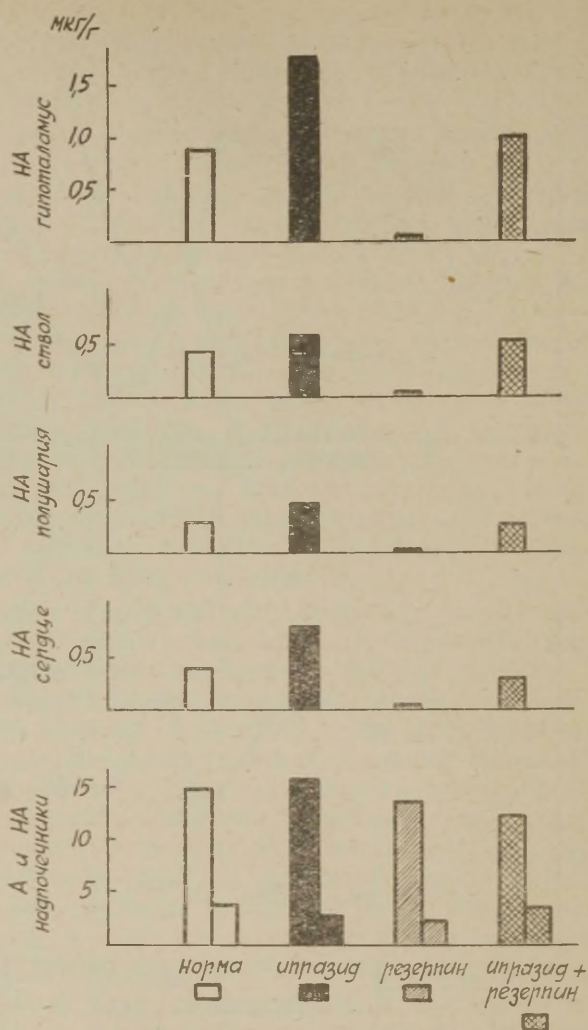


Рис. 2. Содержание адреналина и норадреналина в тканях белых крыс при введении ипразида и резерпина.

естественно, представляло исследование КА в гипоталамусе, занимающем ключевую позицию в «материальном субстрате эмоций» и центральной регуляции вегетативных функций (3); имеются данные, что целый ряд веществ вызывает параллельное падение содержания КА в гипоталамусе и мозговом веществе надпочечников (16).

Проведенные исследования показали, что содержание НА в головном мозгу intactных крыс наиболее высокое в области

гипоталамуса, затем следует остальная часть ствола мозга и полушария. Этот характер распределения НА в головном мозгу хорошо согласуется с данными литературы, полученными в опытах на крысах (17, 18) и других, в основном более крупных видах животных (16, 19, 20). При введении ипразида содержание НА в головном мозгу увеличивалось, причем наиболее резко и закономерно в гипоталамической области, примерно в такой же степени повышалось содержание НА в сердечной мышце. У животных, получавших резерпин, содержание НА в различных отделах головного мозга и сердце резко падало (вплоть до его полного неопределения), вместе с тем количество А в надпочечниках практически не изменялось. В группе крыс, которым резерпин вводился на фоне ипразида, не наблюдалось истощения тканевых ресурсов НА, причем если количество НА в сердце все же уменьшалось, то содержание НА в гипоталамусе не отличалось от нормы или было даже несколько выше. Содержание КА в надпочечниках этой группы животных практически не отличалось от нормы.

Таким образом применение ипразида не только препятствует падению экскреции НА и истощению его тканевых ресурсов, но и предупреждает увеличение экскреции А, отражающее усиление активности мозгового вещества надпочечников. Эти данные в значительной мере подтверждают предположение, что причиной активации мозгового вещества надпочечников при введении резерпина является падение тканевых ресурсов НА, в частности истощение центральных адренергических механизмов. Отмеченные закономерности дают основание предположить, что между центральными адренергическими механизмами и мозговым веществом надпочечников существуют взаимоотношения, аналогичные известным взаимоотношениям внутри регуляторных церебральных систем, когда истощение высших отделов приводит к растормаживанию, активации более глубоких.

Наличие подобных взаимоотношений между центрально-медиаторным и гормональным компонентами симпатико-адреналовой системы может лежать в основе гормонально-медиаторной диссоциации, описанной нами при исследовании экскреции А и НА у психически больных с нарушениями эмоциональной сферы. Тогда же нами было выдвинуто представление о различном генезе симпатикотонии при маниакальной и депрессивной фазах маниакально-депрессивного психоза — преимущественной активации гормонального компонента при депрессии и медиаторного — при мании. Возможно, что в осуществлении антидепрессивного действия ипразида и других ингибиторов МАО имеет значение наряду с повышением содержания НА в головном мозгу, обусловленное этим повышением снижение активности мозгового вещества надпочечников — подавление гормональной симпатикотонии. В этом аспекте, очевидно, могут быть рассмотрены и



данные о т. н. парадоксальном эффекте ингибиторов МАО, снижении различных проявлений симпатикотонии в условиях, способствующих накоплению КА, и связанный, вероятно, с этим широкий спектр терапевтического применения ингибиторов МАО не только как антидепрессантов, но и при таких патологических состояниях, как гипертоническая болезнь, стенокардия и др. (21, 22).

Предпринятая трактовка полученных результатов является предварительной, что обусловлено прежде всего сложным механизмом действия резерпина и ипразида, многообразием их влияний на обмен КА и различные процессы в организме (10, 23, 24). Не ингибиторный механизм действия ипразида и других ингибиторов МАО был рассмотрен на настоящей конференции в докладе А. В. Палладина (25). Мы остановимся еще на одном возможном аспекте действия ипразида — в связи с концепцией А. М. Утевского о биологической значимости переключения обмена КА с одного пути на другой (26).

Известно, что применение ипразида повышает токсическое действие фенамина у сгруппированных белых мышей: увеличивает летальность, усиливает проявления двигательного возбуждения и агрессивности, а также предупреждает защитное действие резерпина (27). Т. к. эффект фенамина обусловлен его влиянием на центральные адренергические механизмы и связан в значительной мере с освобождением НА (28), усиливающее этот эффект действие ипразида рассматривается как результат блокирования инактивации НА на пути дезаминирования. В связи с этим представляло интерес исследовать влияние блокады метоксилирования КА, являющегося также одним из основных путей метаболизма А и НА (29). Можно было предположить, что угнетение катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), обеспечивающей метоксилирование КА, будет, так же как и блокада МАО, усиливать действие фенамина. Учитывая, что под влиянием фенамина НА освобождается экстраневрально, попадая в сферу действия КОМТ, блокада этого фермента могла оказаться даже более эффективной. Однако результаты проведенных нами исследований показали, что предварительное введение сгруппированным белым мышам ингибитора КОМТ — пирогаллола (100 мг/кг за 30—40 мин до введения фенамина в дозе 20 мг/кг) не только не усиливает, но значительно препятствует развитию явлений фенаминовой агрессивности. Нужно отметить, что летальность при этом не уменьшалась, животные погибали без предварительного периода резкой агрессивности. Применение пирогаллола препятствовало также усилению фенаминовой агрессивности, наблюдавшейся при введении ипразида, несмотря на то, что в этой постановке — при блокаде двух основных путей превращения КА (ипразид 100 мг/кг, через 1,5 часа пирогаллол

100 мк/кг, через 30 мин фенамин 10 мг/кг) создавались оптимальные условия для накопления НА.

При интерпретации этих несколько неожиданных данных, полученных при исследовании адренергических механизмов фенаминовой агрессивности, создается впечатление, что возникновение агрессивности связано в основном не с накоплением КА, а с превращением их по пути метоксилирования. В этом плане усиление фенаминовой агрессивности ипразидом может рассматриваться как результат переключения обмена КА с одного пути на другой. Интересно подчеркнуть, что именно в процессе метилирования биологически активных веществ могут возникать метаболиты с психотомиметическим действием, соединения со свойствами «галлюциногенов» (30, 31), в связи с чем путь метоксилирования КА привлекает все большее внимание при изучении патохимических механизмов психических нарушений (32—34, 4, 5).

Резюмируя приведенные факты и аспекты, можно считать, что в катехоламиновой характеристике нарушений эмоциональной сферы и поведения значительное место занимают изменения соотношения между А и НА, между различными путями превращения, а возможно и различными формами накопления и освобождения КА.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cannon W. B., Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear a. Rage, New York, 1929.
2. Elkes J., Monoamines et systeme nerveux central Symposium, Bel-Air, 153, 1961.
3. Гельгорн Э., Луфборроу Д., Эмоции и эмоциональные расстройства, М., 1966.
4. Соркс Т. Л., Ж. всесоюзного химич. об-ва, 9, 381, 1964.
5. Утевский А. М., Бару А. М., Ж. всесоюзного химич. об-ва, 9, 374, 1964.
6. Бару А. М., В кн.: Адреналин и норадреналин, М., 79, 1964.
7. Бару А. М., Тез. докл. I Всесоюз. биох. съезда, Л., 232, 1964.
8. Бару А. М., Биохимия, 27, 260, 1962.
9. Осинская В. О., Биохимия, 22, 537, 1957.
10. Kopin J., Axelrod J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 107, 848, 1963.
11. Costa E., Brodie B. B., Progress in Brain Research, Biogenic Amines, 8, 168, 1964.
12. Калиман П. А., Биохимия, 30, 1194, 1965.
13. Brodie B. B., Pletscher A., Shore P. A., J. Pharmacol. Exp. Therap., 116, 9, 1956.
14. Chessin M., Kramer E. R., Scott C. C., J. Pharmacol. Exp. Therap., 119, 453, 1957.
15. Axelrod J., Progress in Brain Research, Biogenic Amines, 8, 81, 1964.
16. Vogt M., J. Physiol., 123, 451, 1954.
17. Kovacs K., Faredin J., Acta neurovegetativa, 22, 184, 1961.
18. Bertler A., Rosengren E., Acta physiol. scand., 47, 350, 1959.
19. Утевский А. М., Осинская В. О., Могилевский А. Я., Материалы I конф. по пробл. физиол. морфол., фармакол. и клиники ретикул. формации гол. мозга, М., 109, 1960.

20. Carlsson A., Pharmacol. Rev., **II**, part 2, 490, 1959.
21. Brest A. N., Moyer J. H., JAMA, **172**, 1041, 1960.
22. Horwitz D., Sjoerdsma A., Ann. N. Y. Acad. Sci., **107**, 1033, 1963.
23. Giarman N. J., Freedman D., Progress in Brain Research, Biogenic Amines, **8**, 72, 1964.
24. Машковский М. Д., Ж. всесоюзного химич. об-ва, **9**, 433, 1964.
25. Палладин А. В., Труды 4-ой Всесоюзн. конф. по биохимии нервной сис., **9**, 1969.
26. Утевский А. М., Реф. секц. сообщ. 5-го межд. биох. конгресса, М., 1961, **1**, 568.
27. Лапин И. П., Щелкунов Е. Л., Proc. Second Intern. Pharmacol. Meeting, **1**, 205, 1963.
28. Schumann H. J., Ciba foundation symposium; Adrenergic mechanismus, London, **7**, 1960.
29. Axelrod J., Physiol. Rev., **39**, part. I, 751, 1959.
30. Axelrod J., Science, **134**, 343, 1961.
31. Friedhoff A. J., Van Winkle E., J. Nerv. Ment. Dis., **135**, 550, 1962.
32. Osmond H., Smithies J. R., J. Ment. Sci., **100**, 29, 1954.
33. Friedhoff A. J., Van Winkle E., Nature, **199**, 69 and 203, 1963.
34. Brune G. G., Himwich H. E., J. Nerv. Ment. Dis., **134**, 447, 1962.



## О ВЛИЯНИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ИМИПРАМИНА НА АЗОТИСТЫЙ ОБМЕН В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

Э. К. Тийгимяэ

Кафедра биохимии Тартуского государственного университета, Тарту

Одним из наиболее широко применимых антидепрессантов является имипрамин, который после первого клинического применения в 1957 году Куне (1) при эндогенных психозах нашел затем широкое использование в психиатрической практике для лечения депрессивных больных.

Несмотря на многочисленные работы, направленные на выяснение механизма психотропного действия имипрамина, до сих пор этот вопрос остается открытым и объектом дальнейших исследований. Еще в первых фармакологических работах (2—4) был обнаружен холинолитический эффект имипрамина. Помимо центрального холинолитического эффекта, имипрамин имеет и адренопозитивное действие, что считают важным в механизме антидепрессивного действия (5).

Установлено, что имипрамин в малых дозах стимулирует центральные адренэргические синапсы, потенцируя центральное возбуждающее действие фенамина, а в больших дозах обладает седативным и адренолитическим эффектами (6—9). Условно-рефлекторный анализ показал, что имипрамин в малых дозах способствует некоторому повышению процессов возбуждения, а в больших дозах, наоборот, приводит к ослаблению раздражительного процесса (10). В условиях хронического введения имипрамина людям, наблюдается первоначальное угнетение, которое переходит затем в возбуждение (11).

В плане изучения влияния психотропных веществ, в том числе и имипрамина, на обмен аммиака, степень амидирования и некоторые физико-химические свойства белков в нервной ткани в наших предыдущих работах (12, 13) было установлено, что имипрамин в дозе 10 мг/кг не вызывает у морских свинок через 1 час отчетливых изменений в указанных показателях. Учитывая видовые различия в центральном эффекте имипрамина (6), воз-

можно, что эти дозы для морских свинок оказались неэффективными.

В следующих опытах (14) мы увеличили дозу имипрамина до 50 мг/кг веса тела. При этом оказалось, что через 60 мин. уровень свободного аммиака в этих условиях опыта существенно не увеличивается, однако, в количестве связанной, транспортной формы аммиака — глутамина, обнаружено отчетливое статистически достоверное увеличение (от 5,07 мг% до 7,08% мг).

В степени амидирования белков не было обнаружено статистически достоверного изменения, хотя в некоторых опытах отмечалось заметное их дезамидирование. Однако при удлинении действия таких же доз имипрамина до 120 мин происходит статистически достоверное увеличение амидирования белков головного мозга и одновременно уменьшается количество свободного аммиака от 0,45 мг% у контрольных животных до 0,28 мг% у подопытных животных (14). Таким образом, и эти наши опыты являются подтверждением двухфазного действия имипрамина на примере азотистого обмена.

Учитывая приведенные данные, а также то, что имипрамин находит применение в клинике при длительных курсах лечения, нашей дальнейшей задачей являлся анализ действия малых доз имипрамина при его длительном введении. По литературным данным в этих условиях имипрамин оказывает антидепрессивное действие (6). Вместе с тем представлялось интересным, как проявляется сенсibiliзирующее действие имипрамина на действие центедрина при хроническом его введении.

### Методика

Опыты ставились на белых крысах обоего пола. Имипрамин вводился внутримышечно в дозе 10 мг/кг один раз в день. Каждый день перед введением препарата определяли поведение животных по Лату (17) числом вставаний на задние лапы в течение 4 минут, а также локомоторную активность. Животных брали в опыт через 6 и 16 дней после введения препарата. Подопытных животных погружали целиком в жидкий азот. Замороженный мозг извлекался из черепа и растирался в ступке в присутствии жидкого азота до тонкого порошка, из которого брали пробы для определения аммиака и глутамина по Парнасу (18). После предварительного экстрагирования липидов жирорастворителями определяли амидные группы белков по Селигсону (19). Для характеристики физико-химических свойств растворимых белков мозга изучали коэффициент ионизации боковых групп (КИБГ), представляющий собою соотношение интенсивностей ультрафиолетовых спектров поглощения растворимых белков при pH 12,0 и pH 7,0 по Унгару (20). Количество сульфгидрильных групп водорастворимых белков определяли в экстрактах головного мозга спектрофотометрическим методом по Рубиной и Романчук (21). Растворимые белки мозга извлекались по А. В. Палладину и Н. М. Поляковой (22, 23). Параллельно ставились контрольные опыты с введением белым крысам физиологического раствора.

## Результаты опытов и их обсуждение

Оказалось, что при введении имипрамина белым крысам (весом 140—200 г) 10 мг/кг через 4 дня количество вставаний на задние лапы (в течение 4 минут) падает в среднем от 20 до 6,5 раз. У контрольных животных в то же время количество вставаний понижалось от 22 до 15 раз. Уже на восьмой день животные стали подвижными, количество вставаний на задние лапы увеличивалось до 8 раз в течение 4 минут. На двенадцатый день количество вставаний на задние лапы у подопытных животных выше, чем у контрольных (в среднем 29 и 14 раз). У контрольных животных отмечается уменьшение количества вставаний на задние лапы по сравнению с исходными данными, т. е. животные в течение хронического опыта привыкают к условиям опыта и становятся т. н. «подручными».

Следовательно, определение поведения животных при введении имипрамина в дозе 10 мг/кг, обнаруживает двухфазность его действия. Биохимические исследования проведены в первой серии опытов на седьмой день после хронического введения имипрамина. Для этой серии опытов использовались относительно молодые животные самки весом 140—160 г. Количество свободного преформированного аммиака у контрольных животных было 0,74 мг%. После ежедневного введения имипрамина в дозе 10 мг/кг в течение 6 дней количество свободного аммиака уменьшалось до 0,51 мг%. Это уменьшение оказалось

Таблица 1

Азот аммиака (АА), амидный азот глутамина (ААГ), амидный азот белков (ААБ) и количество сульфгидрильных групп белков (СГБ) головного мозга у крыс при введении имипрамина в дозе 10 мг/кг в течение 6 дней

№ опы-та	АА (мг%)		ААГ (мг%)		ААБ (мкг/г ткани)		СГБ (мг/г ткани)	
	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин
1	0,71	0,50	7,43	7,47	837	926	31,6	30,4
2	0,69	0,52	7,79	9,00	843	964	31,8	27,8
3	0,71	0,51	7,98	9,12	840	826	31,7	26,2
4	0,88	0,51	7,21	8,81	846	918	29,6	25,4
5	0,69	0,52	6,70	8,63	858	940	26,8	24,3
6	0,73	0,51	7,21	8,80	840	890	29,8	24,1
Сред-нее	0,74	0,51	7,42	8,64	844	911	30,2	26,4
t =	6,43		3,85		3,46		2,66	
p	< 0,001		< 0,005		< 0,005		< 0,025	



статистически достоверным ( $p < 0,001$ ; таблица 1). В то же время происходит связывание аммиака как в форме глутамина, так и амидных групп белков головного мозга. Увеличение количества амидного азота глутамина (от 7,21 мг% у контрольных животных до 8,64 мг% у подопытных животных), а также амидирование белков мозга оказались статистически достоверным. Эти изменения в азотистом обмене, по данным предыдущих работ нашей кафедры (15, 16), соответствуют тормозному состоянию в ЦНС.

При определении сульфгидрильных групп водорастворимых белков в этих условиях опыта оказалось, что количество их статистически достоверно уменьшается. Эти данные согласуются и с данными других авторов, которые получили уменьшение количества сульфгидрильных групп при торможении (24).

Во второй серии опытов нами изучались изменения в азотистом обмене и в количестве сульфгидрильных групп водорастворимых белков при введении имиπραмина в дозе 10 мг/кг в течение 14—16 дней. Оказалось, что в этих условиях опыта по сравнению с предыдущей серией происходит увеличение количе-

Таблица 2

Азот аммиака (АА), амидный азот глутамина (ААГ), амидный азот белков (ААБ) и количество сульфгидрильных групп белков (СГБ) головного мозга у крыс при введении имиπραмина в дозе 10 мг/кг в течение 14—16 дней

№ опыта	АА (мг%)		ААГ (мг%)		ААБ (мкг/г ткани)		СГБ (мг/г белка)	
	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин	Конт-роль	Имип-рамин
1	0,69	0,49	8,34	8,27	871	845	26,8	24,7
2	0,68	1,54	8,54	—	873	966	20,0	22,2
3	0,65	0,73	8,21	7,79	858	978	31,6	19,9
4	0,55	1,36	8,66	6,03	846	903	31,8	28,8
5	0,69	1,85	8,50	8,71	840	950	31,7	29,3
6	0,64	—	—	—	860	853	31,6	30,0
7	0,64	1,13	—	7,21	—	870	—	27,6
8	0,58	0,63	6,48	6,14	786	745	23,4	23,3
9	0,63	0,92	6,14	6,57	751	719	23,6	25,3
10	0,99	0,93	5,51	4,49	791	757	22,8	25,4
11	0,65	0,61	6,99	7,65	—	742	—	21,8
12	0,55	0,85	5,47	5,49	—	808	—	23,1
13	0,69	0,96	6,69	5,00	—	751	—	26,1
				7,25		825		
t =	0,66	1,00 2,93	7,24	6,72 0,78	830,7	836,6	27,03	25,2 1,1
p	<0,01		>0,4 не достоверно				>0,25	

ства свободного аммиака (от 0,51 мг% до 1,07 мг%). Это увеличение вдвое больше по сравнению с контролем и оказалось статистически достоверным (таблица 2).

Если амидный азот глутамина в конце первой недели введения имипрамина увеличивается (от 7,42 мг% до 8,64 мг%), то на 14—16 день после введения препарата наблюдается, наоборот, уменьшение количества амидного азота глутамина (от 8,64 мг% до 6,72 мг%), что даже меньше, чем у контрольных животных. Амидный азот белков на 14 день, по сравнению с данными, полученными на 7 день, уменьшается от 911 мкг/г ткани до 837 мкг/г ткани и остается в пределах данных, полученных у контрольных животных.

Количество сульфгидрильных групп водорастворимых белков уменьшается при введении имипрамина в течение 7 дней, но на 14 день количество их остается в пределах нормы. При изучении физико-химических изменений при хроническом введении имипрамина в течение 14 дней наблюдается повышение КИБГ при 300 ММК. По Унгару (20) такие изменения характерны для повышенной активности нервной деятельности. Таким образом, при хроническом введении малых доз имипрамина в различные периоды проявляется двухфазность действия этого антидепрессанта.

В поисках установления механизма антидепрессивного действия имипрамина на ЦНС были представлены данные о сенсибилизирующем действии имипрамина на адренэргические структуры (6—9). Наши предыдущие работы с однократным введением имипрамина (12, 13) по динамике азотистого обмена в мозгу подтвердили также сенсибилизирующее влияние имипрамина на действие подпороговых доз центедрина. Поэтому представляло интерес изучение сенсибилизирующего влияния имипрамина при его хроническом введении на действие центедрина.

Оказалось, что в состоянии угнетения, вызванном хроническим введением имипрамина в течение 6 дней, введение животным малых доз центедрина (5 мг/кг), не вызывающих сами по себе изменений в функциональном состоянии и в азотистом обмене мозга, приводит к потенцированию состояния торможения. Это находит свое выражение в еще большем снижении количества свободного аммиака (табл. 3) и уменьшении сульфгидрильных групп водорастворимых белков головного мозга (табл. 4).

Однако через 16 дней после ежедневного введения таких же доз имипрамина у животных отмечалось по реакциям поведения значительное возрастание функциональной активности нервной системы до уровня контрольных животных и даже выше. Биохимический анализ выявил, что в мозгу происходит накопление аммиака.

Таблица 3

Азот аммиака (АА) и амидный азот глутамина (ААГ) в мозгу белых крыс при однократном введении центедрина, хроническом введении имиπραмина (10 мг/кг в течение 6 дней) и при однократном введении центедрина после предварительного хронического введения имиπραмина (10 мг/кг в течение 6 дней)

№ опыта	АА (мг%)				ААГ (мг%)			
	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Имипрамин + центедрин	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Имипрамин + центедрин
1	0,71	0,68	0,50	0,34	7,43	7,21	7,47	8,02
2	0,69	—	0,52	0,26	7,79	—	9,00	8,11
3	0,71	0,71	0,51	0,32	7,98	—	9,12	8,11
4	0,88	—	0,51	0,28	7,21	—	8,81	7,79
5	0,69	0,69	0,52	0,31	6,70	7,40	8,63	7,65
6	0,73	—	0,51	0,31	7,21	—	8,80	—
Среднее	0,74	0,69	0,51	0,30	7,42	7,35	8,64	7,92
t =			6,43	13,22			3,85	1,65
p =			< 0,001	< 0,001			< 0,005	> 0,05

Таблица 4

Амидный азот белков (ААБ) и количество сульфгидрильных групп белков (СГБ) в мозгу крыс при однократном введении центедрина, хроническом введении имиπραмина (10 мг/кг в течение 6 дней) и при однократном введении центедрина после предварительного хронического введения имиπραмина (10 мг/кг в течение 6 дней)

№ опыта	ААБ (мк/г ткани)				СГБ (мг/г белка)			
	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Центедрин + имипрамин	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Центедрин + имипрамин
1	837	840	926	886	31,6	—	30,4	25,1
2	843	—	964	870	31,8	—	27,8	28,7
3	840	—	826	877	31,7	—	26,2	27,3
4	846	—	918	—	29,6	27,8	25,4	26,6
5	858	844	940	868	26,8	—	24,3	—
6	840	—	890	862	29,8	—	24,1	—
Среднее	844	842	911	873	30,3		26,4	26,9
t =		3,46		1,88			2,66	2,4
p =		< 0,005		> 0,05			< 0,025	< 0,05



Азот аммиака (АА) и амидный азот глутамина (ААГ) в мозгу крыс при однократном введении центедрина, хроническом введении имипрамина (10 мг/кг в течение 14—16 дней) и при однократном введении центедрина после предварительного хронического введения имипрамина (10 мг/кг в течение 14—16 дней)

№ опыта	АА (мг%)				ААГ (мг%)			
	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Имипрамин + центедрин	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Имипрамин + центедрин
1	0,69	0,63	0,49	0,58	8,34	8,30	8,27	8,46
2	0,68	0,94	1,54	0,76	8,54	8,12	9,34	8,03
3	—	—	0,73	1,47	—	—	7,79	7,77
4	0,65	—	1,36	0,69	8,21	—	—	6,28
5	0,55	—	1,85	2,28	8,66	—	6,03	6,99
6	0,69	—	—	0,60	8,50	—	8,71	7,25
7	0,64	—	—	2,24	—	—	—	5,70
8	0,64	0,70	1,13	0,72	—	8,30	7,21	7,88
9	0,58	—	0,63	—	6,48	—	6,14	—
10	0,63	0,60	0,92	—	6,14	6,00	6,57	—
11	0,99	—	0,93	—	5,51	—	4,49	—
12	0,65	0,62	0,61	—	6,99	5,70	7,65	—
13	0,55	—	0,85	—	5,47	—	5,49	—
14	0,69	—	0,96	—	6,69	—	5,00 7,25	—
Среднее	0,66	0,70	1,07	1,15	7,09	7,28	6,92	7,30

При введении этим животным подпороговых доз центедрина проявляется его стимулирующее действие, что выражается в поведении животных и в усиленном образовании аммиака (табл. 5). При этом отмечается индивидуальная реакция животных на введенные препараты. Так, в опытах 1, 3, 11, 12 количество аммиака существенно не изменяется, но в других опытах (2, 4, 5, 8) происходит увеличение количества аммиака в 3—4 раза по сравнению с контрольными животными и почти в 2 раза по сравнению с подопытными животными, которым вводили только имипрамин на протяжении 14—16 дней.

В количестве амидного азота глутамина и в амидных группах белков наблюдается некоторое амидирование (табл. 5 и 6).

Количество сульфгидрильных групп водорастворимых белков по сравнению с хроническим введением малых доз имипрамина в течение 14—16 дней, под влиянием подпороговых доз центедрина увеличивается и достигает контрольных цифр (табл. 6).

Амидный азот белков (ААБ) и количество сульфгидрильных групп белков мозга крыс (СГБ) при однократном введении центедрина, хроническом введении имипрамина (10 мг/кг в течение 14—16 дней) и при однократном введении центедрина после предварительного хронического введения имипрамина (10 мг/кг в течение 14—16 дней)

№ опыта	ААБ (мк/г ткани)				СГБ (мг/г белка)			
	Контроль	Центедрин	Имипрамин	Имипрамин + центедрин	Контроль	Центедрин через 60 мин.	Имипрамин в течение 6 дней	Имипрамин в те- чение 6 дней + центедрин, 60 мин.
1	871	910	845	927	26,8	23,6	24,7	25,1
2	873	905	966	844	20,0	27,8	22,2	22,7
3	—	—	978	813	—	—	19,9	26,1
4	858	—	903	960	31,6	—	28,8	28,6
5	846	—	950	869	31,8	—	30,0	29,4
6	840	—	853	945	31,7	—	29,3	33,6
7	—	—	—	865	—	—	—	30,0
8	860	912	870	855	31,6	24,4	27,6	25,8
9	—	—	—	822	—	—	—	27,7
10	786	—	745	—	23,4	—	23,3	—
11	751	—	719	—	23,6	—	25,5	—
12	791	—	757	—	22,8	—	25,4	—
13			742				21,8	
			808				23,1	
			751				26,1	
			825					
Среднее	830,7	909,0	836,6	877,8	27,03	25,27	25,2	27,67

Таким образом, эти данные по динамике азотистого обмена могли бы быть одним из биохимических подтверждений сложного двухфазного действия имипрамина на функциональное состояние ЦНС в условиях его хронического введения. Вместе с тем они говорят о подвижности и обратимости амидирования белков мозга параллельно с изменением его функционального состояния.

### Выводы

1. При хроническом введении имипрамина в дозе 10 мг/кг белым крысам по феномену вставания на задние лапы проявляется первоначально угнетение, которое переходит в конце 2-й недели в состояние возбуждения.

2. На седьмой день после хронического введения имиπραмина (в фазе торможения) уменьшается количество свободного аммиака. Одновременно увеличивается степень амидирования как глутаминовой кислоты, так и амидных групп белков головного мозга. Количество сульфгидрильных групп водорастворимых белков в этот период уменьшается.

3. При удлинении действия имиπραмина до 14—16 дней количество аммиака значительно увеличивается. В количестве амидного азота глутамина, амидных и сульфгидрильных групп белков головного мозга белых крыс существенных изменений не наблюдается.

4. При введении белым крысам в тормозном состоянии (на 7 день после хронического введения имиπραмина, 10 мг/кг) подпороговых доз центедрина (5 мг/кг), не вызывающих сами по себе изменений в азотистом обмене, еще сильнее уменьшается количество свободного аммиака. В этих опытах степень амидирования глутаминовой кислоты и белков увеличивается меньше, чем при введении только имиπραмина в течение 6 дней.

5. На фоне хронических инъекций имиπραмина (10 мг/кг) в течение 14—16 дней введение центедрина (5 мг/кг) увеличивает образование аммиака в головном мозгу. В других изученных нами показателях статистически достоверных изменений не обнаружено.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kuhn R., Schweiz. Med. Wschr., 87, 1135, 1957.
2. Sigg E. B., Fed. Proc., 18, 144, 1959.
3. Bradley P., Key B., Brit. J. Pharmacol., 14, 340, 1959.
4. Osborne M., Sigg E. B., Arch. Internat. Pharmacodyn., 129, 273, 1960.
5. Михельсон М. Я., Щелкунов Е. Л., Симпозиум: «Влияние психотропных препаратов на высшую нервную деятельность», Л., 43, 1963.
6. Лапин И. П., Ж. невропатол. и психиатр., 63, 4, 613, 1963.
7. Лапин И. П., Хаунина Р. А., Щелкунов Е. Л., Ж. невропатол. и психиатр., 2, 183, 1962.
8. Sigg E. B., Canad. Psychiatr. Assoc. J., 4, 75, 1959.
9. Лапин И. П., Ж. Всесоюзного химического общества им. Менделеева, 9, 4, 438, 1964.
10. Успенский Ю. Н., Савчук В. И., Раппопорт А. Я., Тиркель-тауб Ф. А., в кн.: Условнорефлекторный анализ действия психотропных веществ, М., 1964.
11. Олнес Р., Асланов А., Реф. ж. «Химия», «Биологическая химия», 14, 1231, 1963.
12. Тийгимяэ Э. К., Тяхепыльд Л. Я., Уч. записки ТГУ, Труды по медицине, XI, 231, 1965.
13. Тийгимяэ Э. К., Тяхепыльд Л. Я., Материалы II биохимической конференции Прибалтийских республик и Белоруссии, Рига, 31, 1965.
14. Тийгимяэ Э. К., Вопр. клин. неврол. и психиатрии, Тарту, 4, 113, 1965.
15. Мартинсон Э. Э., Тяхепыльд Л. Я., Вопр. клин. неврол. и психиатр., Тарту, 3, 40, 1963.
16. Тяхепыльд Л. Я., Вопр. мед. химии, 8, 264, 1962.



17. Lat J., Pharmacology of Conditioning, Learning, and Retention, I, 47, 1965  
(Second International Pharmacological Meeting, Prague, 1963).
18. Parnas J. K., Heller J., Biochem. Z., 152, 1, 1924.
19. Seligson D., Seligson H., J. Lab. Clin. Med., 38, 324, 1951.
20. Ungar G., Aschheim E., Psychoyos B., Romano D., J. Gen.  
Physiol., 40, 635, 1956.
21. Рубина X. М., Романчук Л. А., Вopr. мед. химии, 7, 6, 652, 1961.
22. Палладин А. В., Полякова Н. М., Силич Т. Л., Физиол., ж.  
СССР, 43, 611, 1957.
23. Палладин А. В., Полякова Н. М., ДАН СССР, 107, 568, 1956.
24. Тютюнников В. П., Автореф. канд. дисс., Ростов-на-Дону, 1964.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГУ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

М. Н. Маслова

Лаборатория биохимии Института токсикологии МЗ СССР, Ленинград

Многочисленные исследования, посвященные изучению обмена мозга при возбуждении, дали огромный фактический материал, однако полученные разными авторами данные часто плохо согласуются между собой, а нередко и противоречивы. В последние годы было опубликовано несколько обзоров, в которых имеющаяся литература систематизирована (1—5).

Отмеченная пестрота результатов могла быть связана с целым рядом фактов, среди которых существенное значение имеют условия постановки экспериментов (опыты ставились на разных видах животных, для вызова состояния возбуждения использовали различные экспериментальные воздействия, мозг животных брали на исследование в разное время и т. п.). Кроме того, в подавляющем большинстве работ не учитывали фазность протекающих процессов, что связано с отсутствием объективной оценки функционального состояния ЦНС, и, наконец, не учитывали состояние ведущих жизненно важных систем организма — кровообращения и дыхания.

Необходимость учета перечисленных выше факторов при постановке эксперимента диктуется сложностью мозга как объекта исследования. Хорошо известна мозаичность протекающих в центральной нервной системе процессов: группы клеток, находящиеся в состоянии возбуждения, перемежаются с участками фоновой активности и группой клеток, находящихся в состоянии торможения. Этот факт объясняется давно установленным физиологами положением о том, что реакции отдельных нейронов коры на действие одного и того же раздражителя различны (6, 7) и, кроме того, меняются во времени.

Совершенно очевидно, что большинство существующих методов биохимического исследования, при которых анализируется мозг целиком или крупные анатомические отделы мозга, могут

дать лишь суммарное, усредненное представление об интенсивности протекающих в ткани биохимических процессов, которое не всегда легко связать с характером функционального состояния мозга. Эта трудность в известной степени может быть преодолена путем создания таких экспериментальных условий, когда изучению подвергаются разлитые состояния, при которых большинство клеток находится в однозначном состоянии возбуждения (например, судороги). Отведением биотоков от отдельных нейронов с помощью микроэлектродов было показано, что появление на электроэнцефалограмме судорожных разрядов связано с увеличением числа синхронно работающих нейронов (8).

Большая зависимость обмена мозга от доставки кислорода, глюкозы и других веществ диктует еще одно методическое положение, которое необходимо соблюдать при проведении функционально-биохимических исследований, а именно: проведение оценки общего состояния организма и, в основном, кровообращения и дыхания. Возможность нарушения этих систем при различных функциональных состояниях мозга вполне реальна и неоднократно описана многими авторами.

На основании вышеизложенного, правильное представление о связи функциональных и биохимических данных в ЦНС при использовании обычных методов биохимического исследования может быть получено только при выполнении трех условий: 1) должна производиться объективная регистрация функционального состояния мозга, 2) должна производиться объективная оценка общего состояния организма (по состоянию системы кровообращения и дыхания), 3) изучению должны подвергаться разлитые состояния.

Функционально-биохимическое изучение обмена мозга при возбуждении, проведенное нами при соблюдении перечисленных выше условий, позволило выявить некоторые общие закономерности.

Опыты были проведены на различных экспериментальных животных (мыши, крысы, кролики и кошки) при состоянии разлитого возбуждения (судороги), вызванного различными химическими (пикротоксин, коразол, фосфакол, диизопропилфторфосфат) и физическими (электрический ток, звук) факторами. Функциональное состояние мозга оценивали методом электроэнцефалографии (ЭЭГ), общее состояние организма определяли путем регистрации кровяного давления и дыхания.

При введении животным судорожных доз различных веществ функциональное состояние мозга изменяется следующим образом (рис. 1, кривая 2): на электроэнцефалограмме регистрируются низкоамплитудные колебания, характеризующие возбуждение ретикулярной формации ствола мозга (предсудорожная фаза), животное при этом настороженное, беспокойное, дыхание учащено. Затем регистрируются высоковольтные



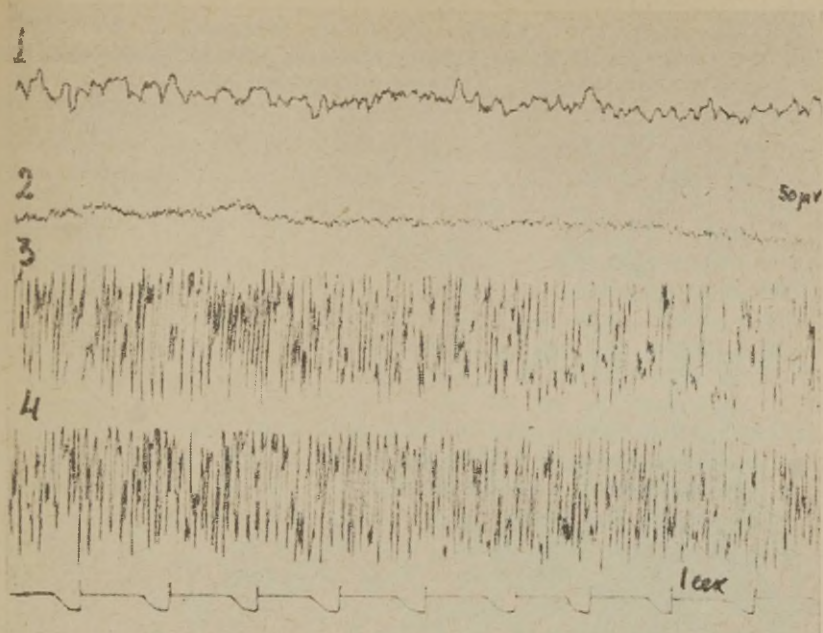


Рис. 1. ЭЭГ кошки (двигательная область) при введении пикротоксина.  
1 — запись ЭЭГ в норме; 2 — предсудорожная фаза; 3, 4 — судороги.

судорожные разряды (3, 4), появляются судорожные потягивания сначала мышц морды, которые быстро распространяются на все мышцы тела, животное падает на бок и наступает приступ клонических и тонических судорог.

Проведенный многими авторами анализ ЭЭГ показал, что судорожные разряды оказываются синхронными во всех корковых и подкорковых отведениях (9, 10). Следует отметить, что как предсудорожная, так и судорожная фазы захватывают все отделы мозга, т. е. эти процессы являются разлитыми. Отмеченный характер изменения ЭЭГ при применении различных судорожных веществ оказался очень похожим у всех исследуемых животных. Длительность фаз, а также скорость смены одной фазы другой зависят от физико-химических особенностей примененного вещества и его дозы, а также от исходного функционального состояния животных. Изучение уровня макроэргических соединений в полушариях мозга при судорогах (табл. 1), проведенное с помощью хроматографического разделения адениловых производных на бумаге, показало, что суммарное содержание АТФ (АТФ + АДФ + АМФ) и КФ или не меняется, или снижается (опыты проведены совместно с Б. П. Царевым).

Таблица 1

Содержание макроэргических фосфорных соединений (в мг%) в мозгу крыс при судорогах, вызванных пикротоксином

	Норма (10) *	1 мин (6)	10 мин (7)	30 мин (8)
АТФ	$15,2 \pm 0,3$	$15,5 \pm 0,9$	$16,2 \pm 1,4$	$10,0 \pm 0,9$
АДФ	$3,5 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,4$
АМФ	$0,6 \pm 0,07$	$0,7 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,02$
КФ	$12,8 \pm 0,4$	$12,2 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,8$

\* В скобках — число животных.

Из таблицы видно, что только при длительных (30 минут) судорогах отчетливо снижается уровень АТФ и КФ и значительно увеличивается содержание АМФ. Проведенный физиологический анализ показал, что наблюдаемое при длительных судорогах снижение свободных нуклеотидов имело место только тогда, когда было нарушено кровоснабжение мозга. Во всех остальных случаях, при интенсивных и длительных судорогах уровень макроэргических фосфорных соединений не изменялся. Была получена четкая зависимость между содержанием макроэргических фосфатов и состоянием животного при судорогах (см. табл. 2).

Таблица 2

Содержание макроэргических фосфатов (мг%) в полушариях мозга крыс при 60-минутных судорогах, вызванных диизопропилфторфосфатом

АТФ	АДФ	АМФ	Состояние животных
$15,2 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,07$	Норма
17,5	3,8	0,7	Удовлетв.
15,8	3,5	0,6	"
14,4	3,7	0,7	"
13,4	4,0	1,2	Тяжелое
10,2	3,9	1,3	"
9,3	3,8	1,6	"

Хорошо видно, что при тяжелом состоянии организма (нарушение кровообращения и дыхания) найдено значительное снижение АТФ и возрастание уровня АМФ и АДФ. В то же время у животных, у которых, несмотря на судороги, общее состояние организма было удовлетворительным, изменений в уровне макроэргических соединений не было. Зависимость эта была настолько четкой, что по кимограмме можно было предсказать

результат биохимического анализа мозга; во всех случаях, когда кровяное давление поддерживалось на низком уровне (20—60 мм рт. ст. — кошки, кролики), содержание макроэргических фосфатов снижалось и прежде всего за счет уменьшения уровня АТФ. Количество АМФ при этом увеличивалось в 2—3 раза, а содержание АДФ менялось значительно меньше (на 10—15%). Наши данные еще раз подтверждают факт высокой устойчивости уровня АДФ.

Среди физиологических механизмов, обеспечивающих поддержание постоянного уровня макроэргических соединений мозга при различных условиях существования организма, важная роль принадлежит механизмам регуляции мозгового кровообращения, которые обеспечивают надежное приспособление мозга к изменяющимся условиям. Ранее нами было установлено (11), что нарушение дыхания в значительно меньшей степени сказывается на уровне АТФ и КФ, чем нарушение кровоснабжения мозга.

Следует отметить, что при ненарушенном кровоснабжении мозга, несмотря на интенсивные и длительные судороги, уровень макроэргических соединений мозга остается неизменным и изменяется только перед гибелью животных, когда резко падает кровяное давление. Этот вывод был подтвержден при изучении различных судорожных воздействий и на разных видах животных. Интересно отметить, что при определении уровня макроэргических соединений в стволовых отделах мозга (варолиев мост и продолговатый мозг), даже при общем тяжелом состоянии животных, когда в полушариях мозга было обнаружено значительное снижение уровня АТФ и увеличение количества АМФ, в стволовых отделах мы не наблюдали изменений в системе АТФ.

Эти данные свидетельствуют о высокой устойчивости жизненно важных отделов мозга к повреждающим воздействиям (в данном случае — к гипоксии).

Отсутствие изменений в уровне макроэргических соединений мозга при состоянии разлитого возбуждения еще раз говорит о важной роли этих веществ для обеспечения функциональной деятельности ЦНС.

При изучении скорости обновления белков мозга (как суммарных белков, так и фракции фосфопротеидов) при судорогах мы получили принципиально такие же результаты. У всех изученных животных при судорогах, вызванных различными агентами, скорость обновления белков, которую мы оценивали по О.У.А. в различных отделах мозга, или не изменялась, или значительно снижалась (12). Наиболее выраженные изменения скорости обновления белков наблюдались в сером веществе полушарий мозга, в промежуточном мозге и в части опытов в мозжечке. И в этом случае оказалось, что при судорогах, незави-



симо от их происхождения, скорость обновления белков четко коррелирует с общим состоянием организма (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

О.У.А. суммарных белков различных отделов мозга кошек при судорогах, вызванных фосфаколом

Группа	Серое вещ-во	Промежут. мозг	Средний мозг	Продолг. мозг	Мозжечок	Состояние животных
I	$21,2 \pm 1,3$	$16,3 \pm 1,2$	$14,8 \pm 1,5$	$11,3 \pm 1,2$	$30,1 \pm 2,5$	Норма
	21,4	19,3	12,8	10,3	28,4	Удовлетв.
	21,6	17,4	14,0	13,1	32,6	"
	19,4	18,3	17,1	9,6	28,0	"
	23,1	14,6	14,8	10,1	27,3	"
	18,7	12,8	13,2	12,4	31,4	"
II	4,6	5,3	12,1	11,1	25,2	Тяжелое
	5,1	4,8	11,6	8,7	13,1	"
	3,2	2,9	15,1	9,8	19,8	"
	1,8	2,1	10,3	12,2	16,3	"
	2,1	3,4	10,9	11,0	4,8	"
	7,4	5,1	10,3	8,1	7,3	"
	1,1	1,0	9,7	9,6	5,1	"

Из таблицы видно, что в случае удовлетворительного состояния животных (1-я группа) скорость обновления белков во всех отделах мозга не изменялась, несмотря на сильные судороги. У тех же животных, у которых судороги сопровождались общим тяжелым состоянием (низкое кровяное давление, нарушение дыхания), скорость обновления белков резко снижалась. Это снижение О.У.А. было отчетливо выражено для белков серого вещества полушарий мозга, промежуточного мозга и мозжечка. В продолговатом и среднем мозге, несмотря на общее тяжелое состояние, О.У.А. белков практически не изменялась. И в этих сериях опыта мы нашли четкую зависимость между скоростью обновления белков мозга при судорогах и уровнем кровяного давления.

При низком кровяном давлении скорость обновления белков серого вещества полушарий и промежуточного мозга значительно ниже, чем при высоком (нормальном) кровяном давлении, независимо от примененного судорожного агента и вида животных. Полученные результаты хорошо совпадали с данными наших работ (11), в которых было показано, что уровень АТФ в мозгу при судорогах зависит от общего состояния организма, в первую очередь от состояния системы кровообращения и, следовательно, кровоснабжения мозга, которое обеспечивает до-

ставку к мозгу кислорода, глюкозы и других необходимых веществ. Недостаток этих веществ снижает синтез макроэргических соединений в мозгу, что неизбежно приводит и к уменьшению скорости синтеза белков.

В полном соответствии с данными, полученными при изучении содержания в мозгу макроэргических соединений, и в этих опытах также было показано, что скорость обновления белков в стволовых отделах мозга даже при тяжелом состоянии организма не меняется; в этих отделах мозга мы также не обнаружили изменения уровня макроэргических соединений фосфора.

Аналогичные данные были получены нами при изучении скорости обновления фракции фосфопротеидов при судорожных состояниях (13).

Изучение содержания низкомолекулярных соединений ГАМК (14—16) и аммиака (17) в мозгу животных при судорогах показало много общего в динамике их изменений при этих состояниях. Наибольший интерес, с нашей точки зрения, представляет найденный нами факт снижения уровня ГАМК и аммиака в предсудорожную фазу (рис. 2). Появление на ЭЭГ низко-

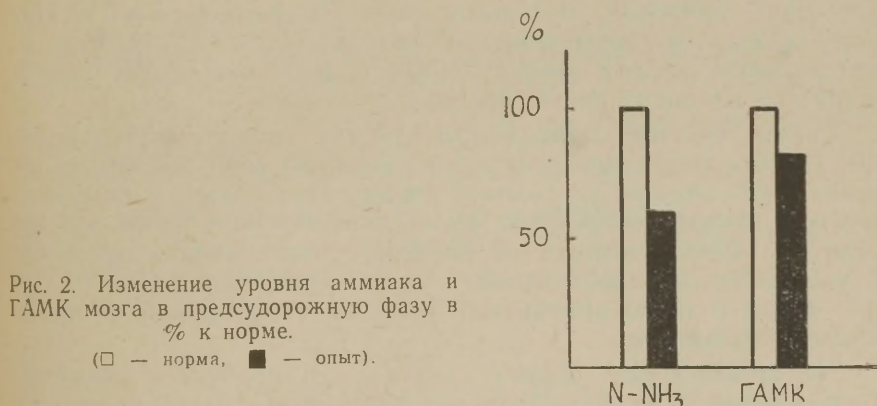


Рис. 2. Изменение уровня аммиака и ГАМК мозга в предсудорожную фазу в % к норме.

(□ — норма, ■ — опыт).

амплитудных колебаний, характерных для предсудорожной фазы, независимо от использованного агента, приводило к снижению уровня ГАМК и аммиака. Проведенный физиологический и фармакологический анализ показал, что предсудорожная фаза связана с возбуждением ретикулярной формации ствола мозга. Во всех случаях при возбуждении ретикулярной формации мозга (нанесение ноцицептивных раздражений, применение фармакологических агентов, раздражение ретикулярной формации и т. п.) отмечено достоверное снижение уровня ГАМК (16). Применение средств, блокирующих ретикулярную формацию (центральные холинолитики, аминазин), снимает реакцию де-

синхронизации, при этом содержание ГАМК не изменяется. Установлено, что функциональный антагонизм между веществами, блокирующими и возбуждающими ретикулярную формацию, имеет и биохимическое отражение в виде изменения обмена ГАМК.

При появлении судорог уровень аммиака в первые минуты резко возрастает, затем, несмотря на продолжающиеся судороги, снижается до нормы. Содержание ГАМК при судорогах меняется следующим образом: с началом судорожного процесса уровень ГАМК возрастает и достигает нормы и держится на этом уровне в течение всего судорожного процесса.

При судорогах, сопровождающихся тяжелым состоянием (низкое кровяное давление и нарушение дыхания), отмечено достоверное повышение уровня ГАМК и аммиака. Специально поставленные опыты с модельным нарушением кровообращения и дыхания показали, что и в этих случаях нарушение кровообращения приводило к более выраженным изменениям обмена мозга, чем нарушение дыхания.

Повышение уровня ГАМК при судорогах находилось в обратной зависимости от общего состояния организма, характеризующегося нами по уровню кровяного давления: чем ниже был уровень кровяного давления, тем выше было содержание ГАМК. При нормальном или повышенном кровяном давлении, несмотря на интенсивные и длительные судороги, содержание ГАМК поддерживается на постоянном уровне.

Таким образом, приведенные данные относительно изменения обмена мозга при состоянии разлитого возбуждения (судороги), полученные на разных экспериментальных животных с использованием различных фармакологических и физических агентов, свидетельствуют об общности протекающих процессов и указывают на необходимость учета функционального состояния мозга и всего организма, а также учета фазности протекающих процессов.

Из приведенных данных следует, что состояние разлитого возбуждения само по себе в условиях нормального кровоснабжения мозга не влияет на уровень макроэргических фосфорных соединений мозга и обмен суммарных белков, а также белков фракции фосфопротеидов мозга. Найденные факты свидетельствуют о высокой пластичности ЦНС и о важном значении стабильного уровня этих соединений для нормальной функциональной деятельности мозга. Изменения уровня ГАМК и аммиака в предсудорожную фазу, по-видимому, имеют пусковое значение, свидетельствующее о сдвигах в обмене мозга в связи с изменяющимися условиями существования. Снижение уровня макроэргических фосфорных соединений, снижение скорости обновления белков мозга, повышение уровня ГАМК и аммиака при тяжелом состоянии организма характеризуют неспецифические изме-



нения обмена, связанные с развивающейся гипоксией мозга, которые отражают срыв механизмов, обеспечивающих постоянство, стабилизацию условий, в которых протекает жизнедеятельность клеток нервной системы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, Киев, 1965.
2. Розенгарт В. И., Маслова М. Н., Вопросы мед. химии, **9**, 13, 1963.
3. Маслова М. Н., Сытинский И. А., Ж. невропатол. и псих., **63**, 11, 1734, 1963.
4. Geiger A., In: Neurochemistry, Springfield, Illinois, USA, 128, 1962.
5. Waelsch H., In: Neurochemistry, Springfield, Illinois, USA, 288, 1962.
6. Jung R., Baumgartner G., Pflüg. Arch., **261**, 434, 1955.
7. Ливанов М. И., Проблемы современной нейрофизиологии. М., 37, 1965.
8. Verzeano M., Excerpta Med. Internat. Congr. 37. Internat. Congr. of EEG a. Clin. Neurophys., Roma, 49, 1961.
9. Крейндлер А., Эпилепсия, клинические и экспериментальные исследования. М., 1960.
10. Труды симпозиума по проблеме эпилепсии. М., т. I и II, 1964.
11. Лебедева Е. М., Маслова М. Н., Розенгарт В. И., ДАН СССР, **102**, 3, 563, 1955.
12. Розенгарт В. И., Маслова М. Н., Биохимия, **22**, 6, 947, 1957.
13. Балашова Е. К., Маслова М. Н., Панюков А. Н., Розенгарт В. И., Биохимия, **23**, 5, 674, 1958.
14. Маслова М. Н., Розенгарт В. И., Тр. III Всес. конф. по биохимии нервной системы. Ереван, 153, 1963.
15. Маслова М. Н., Сб.: Роль гамма-аминомасляной кислоты в деятельности нервной системы. Л., 49, 1964.
16. Маслова М. Н., ДАН СССР, **164**, 1, 230, 1965.
17. Розенгарт В. И., Маслова М. Н., Панюков А. Н., ДАН СССР, **110**, 1, 122, 1956.

## ИЗЫСКАНИЕ СРЕДСТВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ СОДЕРЖАНИЕ СЕРТОНИНА В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Т. Ю. Ильющенко, К. С. Шадурский

Отдел радиационной фармакологии Института медицинской радиологии  
АМН СССР, Обнинск

Серотонину приписывается важная роль в регуляции многих физиологических процессов в организме животных и человека. Как известно, он имеет отношение: к регуляции психических процессов; к поддержанию и сохранению нормального уровня кровяного давления; к процессам клеточной пролиферации в норме и патологии — он при подкожном введении обладает свойством тормозить рост злокачественных опухолей, при введении в желудок — увеличивать пролиферацию всех клеточных групп костного мозга, что связано с образованием 5-оксииндолуксусной кислоты; к водному обмену — тормозит мочеотделение, а также оказывает влияние на свертываемость крови, проницаемость клеточных мембран, тонус органов с гладкой мускулатурой; явления анафилаксии и аллергии и другие функции (12, 18, 19, 23—27 и др.).

Кроме перечисленных эффектов, серотонин обладает защитными и лечебными свойствами при лучевых поражениях и кислородной недостаточности (6, 17, 28 и др.).

К сожалению, интимные механизмы включения серотонина в указанные физиологические функции и общебиологические процессы пока остаются не выясненными.

В связи со сказанным перед фармакологами и химиками-синтетиками возникла задача: изыскать средства, влияющие на содержание и обмен серотонина в организме животных и человека. Эти соединения должны уменьшать или увеличивать функциональные свойства серотонина. Достигнуть этого можно применяя химические вещества, которые ингибируют или стимулируют биосинтез серотонина, высвобождают (вытесняют) или способствуют накоплению и удержанию серотонина в органах и тканях, уменьшают или увеличивают чувствительность

серотонин-рецепторов в органах и тканях к эндогенному серотонину.

В указанном направлении уже проведена известная работа. Описано значительное число химических веществ—антагонистов серотонина, обладающих свойством блокировать действие серотонина на органы с гладкой мускулатурой — желудок, кишечник, сосуды и другие (7, 16 и др.).

В нашей лаборатории изучалось более 100 соединений производных 5-окси- и 5-метокси-2-метилиндола, замещенных в 1 и 2 положениях на различные радикалы. Из указанного числа около 40 веществ оказались заслуживающими внимания, а такие соединения, как димекарбин, амендол, оксифемедол, фемедол, ацимедол (условные названия) представляли значительный теоретический и практический интерес. Синтез их осуществлен доктором химических наук А. Н. Гриневым (3, 4). При всестороннем изучении было установлено, что они оказывают существенное влияние на содержание серотонина в ЦНС.

Определение серотонина производилось по методу Вейна (1957) в спинном и продолговатом мозге, мозжечке, варолиевом мосту, среднем мозге, таламусе, гипоталамусе, гиппокампе, хвостатом ядре, коре мозга, в крови и кишечнике через равные промежутки времени в течение 30—40 дней.

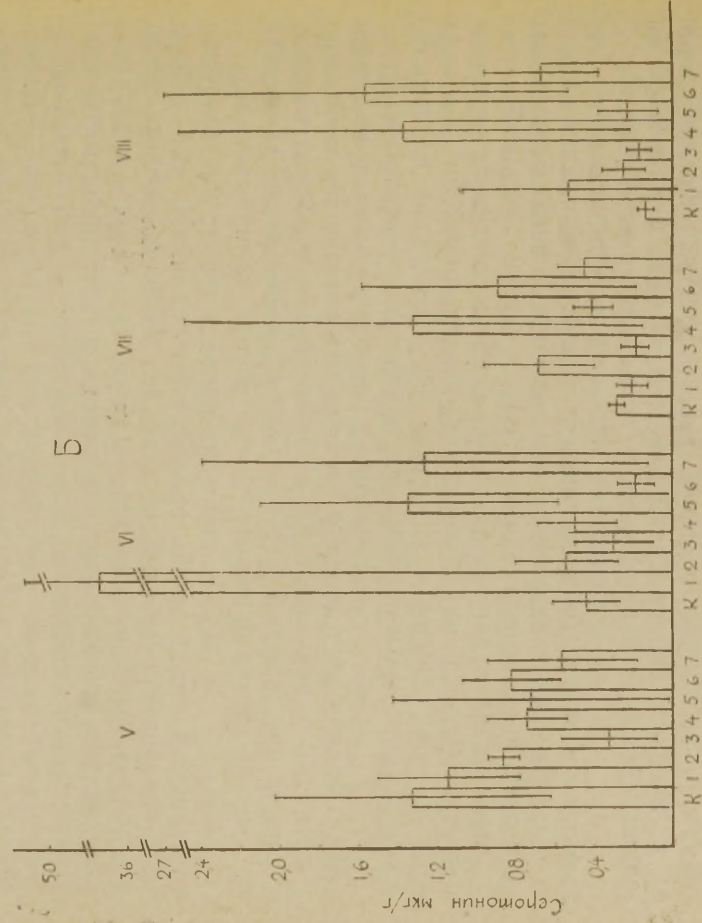
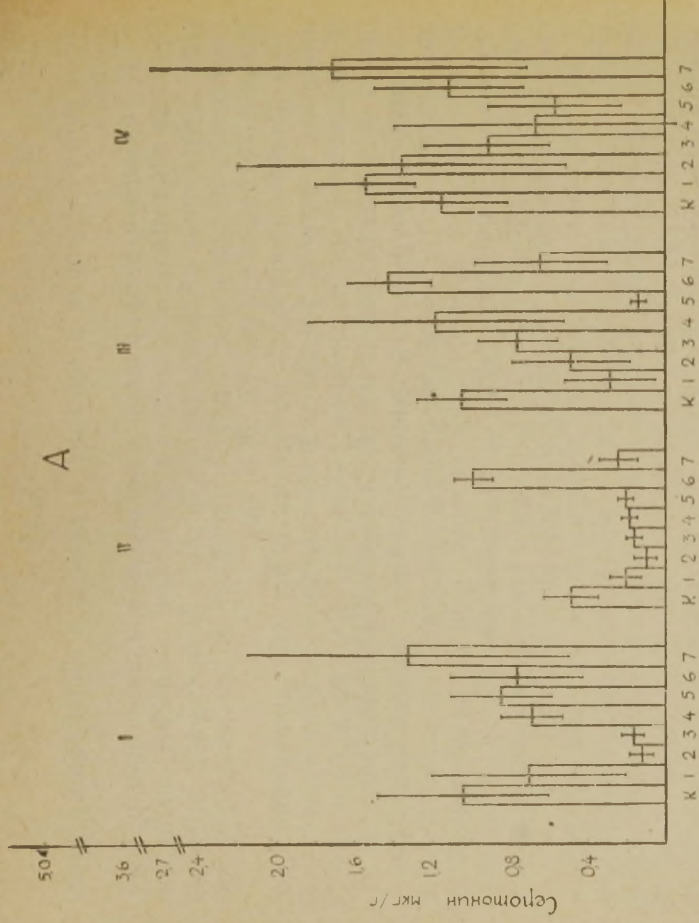
Установлено, что димекарбин при десятикратном введении в дозе 10 мг/кг веса в полость рта вытеснял серотонин из большинства участков ЦНС собак, морских свинок и белых крыс. В четверохолмии и мозжечке собак уменьшение амина сменялось его накоплением. В таламусе и гипоталамусе морских свинок закономерных изменений в чередовании вытеснения и накопления серотонина не обнаружено (рис. 1). Накопление серотонина под влиянием димекарбина происходило в хвостатом ядре морских свинок и собак (20).

При экспериментальной почечной гипертензии (опыты на кроликах) отмечалось увеличение содержания серотонина в среднем мозге и гипоталамусе, в то время как в таламусе и кишечнике количество его падало. В крови содержание серотонина в условиях гипертензии не изменялось.

Производные 5-оксииндола (димекарбин и амендол) и 5-метоксииндола (фемедол) при введении в полость рта в дозе 10 мг/кг нормализовали нарушенное при экспериментальной почечной гипертензии содержание серотонина в среднем мозге, гипоталамусе и таламусе. Накоплению серотонина в хвостатом теле способствовали производные 5-оксииндола не только у здоровых животных (морские свинки, собаки), но и в условиях экспериментальной гипертензии (кролики).

Производные 5-оксииндола (димекарбин и амендол), подобно резерпину, снижают количество серотонина в крови, в то время как производное 5-метоксииндола (фемедол) не оказы-





вало влияния на серотонин, находящийся в кишечнике. В ЦНС (средний мозг, гипоталамус, таламус) они действовали одно-типно.

Параллельно изучалось содержание серотонина в энтерохромафинных клетках Кульчицкого, которые окрашивались по Массону-Гамперлю. Подсчёт клеток производился в 1 см продольного среза двенадцатиперстной кишки, определялась степень насыщенности клетки и индекс грануляции расчетным путем. Пользуясь указанной реакцией, было исследовано влияние многих фармакологических средств, в том числе и производных индола (димекарбин, фемедол, амендол и др.), на энтерохромафинные клетки Кульчицкого (14, 21).

После пятикратного введения в желудок димекарбина и фемедола в дозе 10 мг/кг отмечалось уменьшение содержания гранул секрета энтерохромафинных клеток двенадцатиперстной кишки морских свинок и белых крыс. В опытах с димекарбином число энтерохромафинных клеток восстанавливалось на 30—35-й день, а степень насыщенности — к 45-му дню. Действие фемедола еще более продолжительно (рис. 2).

Резерпин, как показали исследования, опустошал клетки Кульчицкого весьма интенсивно, однако к 8—12-му дню число и степень насыщенности их полностью восстанавливались. Можно думать, что димекарбин, фемедол, амендол и другие производные индола не только способствуют высвобождению серотонина, но, по-видимому, оказывают ингибирующее влияние на его биосинтез.

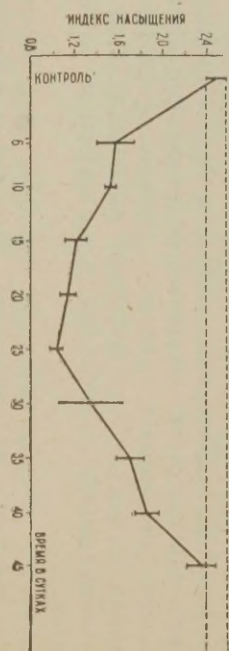
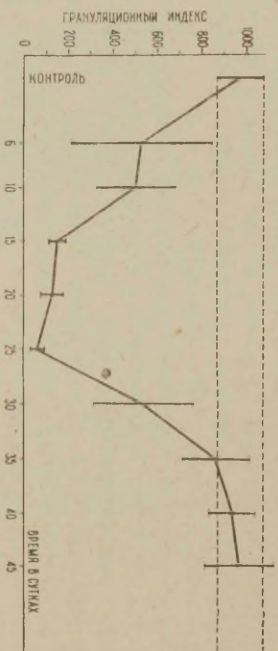
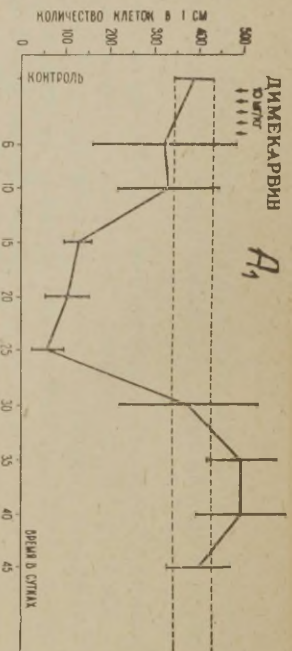
При изучении обезболевающих средств, действующих на ЦНС, было показано, что промедол, фенадон и морфин вызывали уменьшение количества энтерохромафинных клеток, в то время как метиловый эфир морфина (кодеин) увеличивал их число. Длительность этих изменений не превышала 8—12 часов.

Дальнейшие исследования показали, что производные индола, в том числе димекарбин, фемедол, амендол и другие, обладают свойством понижать кровяное давление на продолжительное время, от 30 до 195 дней (1, 2, 5, 8—13). Одно из этих соединений — димекарбин — после клинических испытаний разрешено Фармакологическим комитетом МЗ СССР для медицинского применения и рекомендовано для лечения гипертонической болезни I, II и III-й стадий.

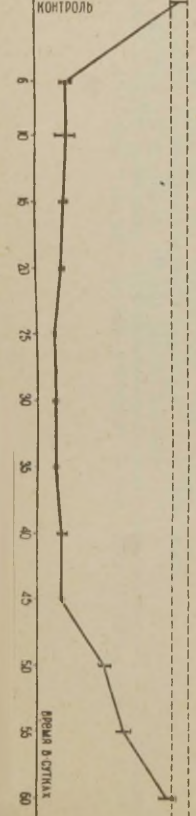
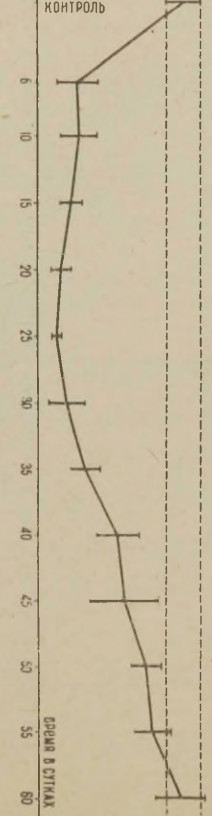
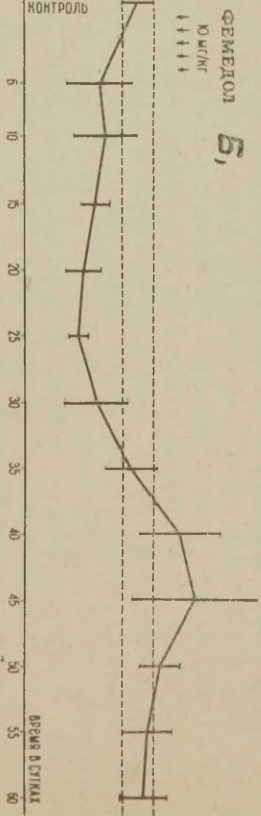
Рис. 1. Влияние димекарбина на содержание серотонина в различных отделах ЦНС морских свинок.

А: I — кора; II — спинной мозг; III — продолговатый мозг; IV — средний мозг. К — контроль; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 — соответственно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45-й дни забоя животных. Б: V — гиппокамп; VI — гипоталамус; VII — таламус; VIII — хвостатое ядро. Обозначения под столбиками те же, что и к рис. 1А.

# ДИМЕКАРВИН А<sub>1</sub>



# ФЕМЕДОЛ Б<sub>1</sub>





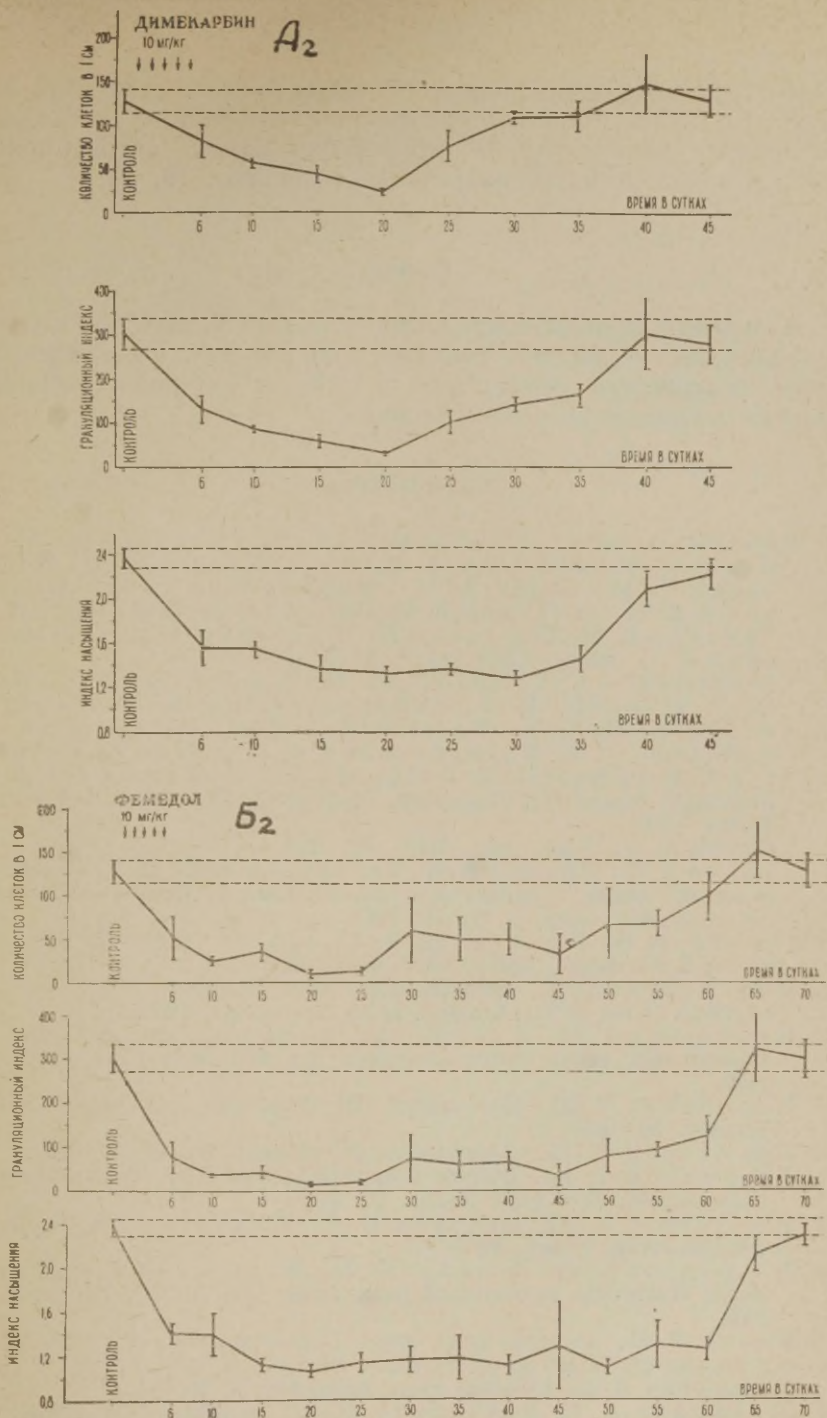


Рис. 2. Влияние димекарбина и фемедола на энтерохромаффинные клетки двенадцатиперстной кишки морских свинок (A<sub>1</sub> и B<sub>1</sub>) и белых крыс (A<sub>2</sub> и B<sub>2</sub>).

Исследуемые соединения нетоксичны для теплокровных животных и не оказывают существенного влияния на активность ферментов (холинэстеразы, моноаминоксидазы, цитохромоксидазы, сукцинатдегидрогеназы и фосфорилазы, 10, 22).

## Вывод

Производные индола являются перспективным классом соединений для изыскания средств, изменяющих на длительное время содержание серотонина в ЦНС и энтеропромафинных клетках двенадцатиперстной кишки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Е. В., Гринёв А. Н., Данусевич И. К., Дзик М. Ф., Дубовик Б. В., Захаревский А. С., Ильюченко Т. Ю., Кост А. Н., Мартинович Г. И., Миклевич А. В., Пильтиенко Л. Ф., Рачковская И. В., Реут Н. А., Талапин В. И., Тамарина Н. З., Терентьев А. П., Шадурский К. С., Вестн. АМН СССР, 1, 69, 1963.
2. Vinogradova E. V., Grinev A. N., Danusevich I. K., Dzik M. F., Dubovik B. V., Zakharevskii A. S., Il'yuchenok T. Yu., Kost A. N., Martinovich G. I., Miklevich A. V., Piltienko L. F., Rachkovskaya I. V., Preut N. A., Talapin V. I., Tamarina N. Z., Terent'ev A. P., Shadurskii K. S., Federation Proceeding, Translation Supplement, 22, 6, part II, T-2130 — T-1138, 1963.
3. Гринёв А. Н., Докт. дисс., МГУ, М., 1958.
4. Гринёв А. Н., Шведов В. И., Терентьев А. П., IX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Секция химии и технологии лекарственных веществ. М., 15, 1965.
5. Гринёв А. Н., Ильюченко Т. Ю., Лепёхин В. П., Шадурский К. С., Вестн. АМН СССР, 9, 55, 1965.
6. Жеребченко П. Г., Автореф. докт. дисс., Л., 1964.
7. Захаревский А. С., Автореф. канд. дисс., Рига, 1963.
8. Ильюченко Т. Ю., В кн.: Фармакол. и токсикол. синтетич. хим. соединений. Сб. научн. работ Минского гос. мед. ин-та, Минск, 23, 77, 1959.
9. Ильюченко Т. Ю., Материалы VIII Всесоюзн. конф. фармакологов, Тбилиси, 59, 1960.
10. Ильюченко Т. Ю., Здравоохранение Белоруссии, 3, 25, 1961.
11. Ильюченко Т. Ю., Вторая Республиканская конф. фармакологов и токсикологов. Тез. докл. Минск, 77, 1963.
12. Ильюченко Т. Ю., Искарёв Н. А., Шадурский К. С. и др., Фармакология, Минск, 1963.
13. Ильюченко Т. Ю., Лепёхин В. П., Шадурский К. С., I научн. сессия Института медицинской радиологии АМН СССР. Тез. докл., 67, 1965.
14. Казей Л. Н., Автореф. канд. дисс., Смоленск, 1966.
15. Кузмицкий Б. Б., Автореф. канд. дисс., Рига, 1964.
16. Миклевич А. В., Автореф. канд. дисс., Минск, 1964.
17. Мозжухин А. С., Рачинский Ф. Ю., Атомиздат, М., 1964.
18. Планельес Х. Х., Попенкова З. А., Серотонин и его значение в инфекционной патологии, М., 1965.

19. Пухальская Е. Ч., Автореф. докт. дисс., М., 1966.
20. Рачковская И. В., Автореф. канд. дисс., Минск, 1964.
21. Талапин В. И., Автореф. канд. дисс., Каунас, 1965.
22. Тамарина Н. З., Автореф. канд. дисс., Минск, 1964.
23. Чернов Г. А., Мед. радиол., 5, 6, 75, 1960; Чернов Г. А., Липац А. А., Патол. физиол. и эксп. терап., 2, 57, 1958.
24. Garattini S., Dukes M. N. G., Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Milan, 1964.
25. Lewis G. P., (ed), 5-Hydroxytryptamine. Pergamon Press, 1958.
26. Maupin B., Biologic. Med., 49, 1, 75, 1960.
27. Page I. N., Physiol. Rev., 34, 3, 563, 1954; 38, 277, 1958.
28. Panasewicz J., Postepy hig. i med. doswiader, 19, 3, 375, 1965.



# ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ НОРАДРЕНАЛИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ НЕКОТОРЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

В. И. Кулинский

Украинский институт усовершенствования врачей, Харьков

Биохимическими и фармакологическими исследованиями последних лет установлено, что норадреналин (НА) содержится в различных отделах ЦНС (1—3) и является одним из важных модуляторов деятельности головного мозга (4, 5). В настоящем сообщении приведены данные о содержании катехоламинов (КА) в головном мозгу при 3 различных типах воздействий: 1) введении фармакологических веществ, прямо влияющих на обмен КА; 2) остром интенсивном раздражении; 3) тяжелом патологическом процессе.

## Методика

В работе использовано 147 мышей, 42 крысы, 40 морских свинок, 98 кроликов и 48 обезьян макак. Ингибиторы МАО и либераторы КА вводились подкожно в объеме 8 мл/кг, цистамин — внутривентриально в объеме 0,5 мл. Ипрарид, фелазин, октатенсин и цистамин растворялись в 0,86% хлористом натрии, гармин — на бидистиллированной воде, резерпин — на 1,7% аскорбиновой кислоте (наличие хлористого натрия существенно понижало растворимость гармина и резерпина). Дозировки и время от введения до исследования были следующими: ипрарид — 100 мг/кг — 22 часа, фелазин — 20 мг/кг — 18 часов, гармин — 30 мг/кг — 1 и 3 часа, октатенсин — 15 мг/кг — 1 и 18 часов, резерпин — 2 мг/кг — 1 и 2 суток, рауседил — 2,5 и 10 мг/кг — 1 и 2 суток, цистамин — 150 мг/кг — 1, 5, 30 и 180 мин. Облучение животных всегда было общим и однократным, для кроликов и свинок — на рентгенаппарате РУМ-3м при 190 кв и фильтрах 0,5 мм  $\text{Cu} + 1$  мм  $\text{Al}$ , для обезьян — на концентрическом кобальтовом  $\gamma$ -облучателе. Животных умерщвляли декапитацией, головной мозг обычно разделяли на полушария и ствол (мозжечок не исследовался). КА определяли триоксииндоловой методикой Осинской (6) в нашей модификации (7).

## Результаты исследования

Данные для нормальных животных приведены на рис. 1. У морских свинок, крыс и мышей концентрация НА в стволовой части в 1,5—2,0 раза выше, чем в полушариях. Адреналин (А) не обнаруживался. Существенных видовых отличий не отмечает-

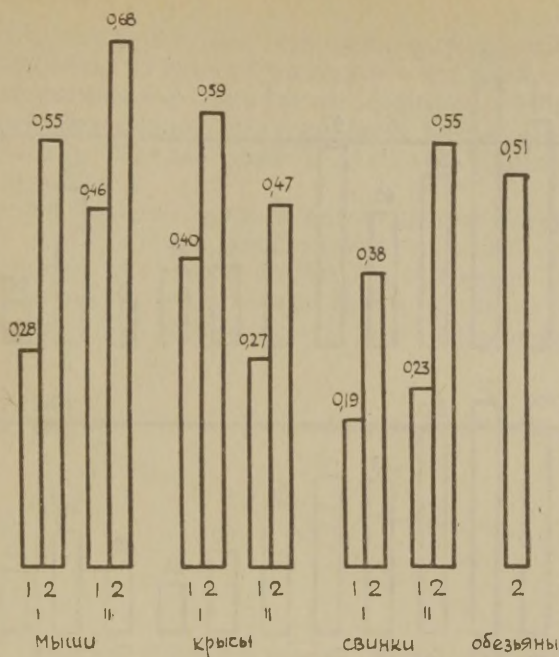


Рис. 1. Средняя концентрация (мкг/г) норадреналина в головном мозгу нормальных животных различных видов.

1 — большие полушария, 2 — ствол головного мозга. Данные для обезьян представляют усредненную концентрацию по продолговатому мозгу, варолиеву мосту, среднему мозгу и гипоталамусу.

ся, скорее обращают внимание реальные различия между сериями животных одного и того же вида (эти серии были получены из разных животных и исследовались в разные сезоны). У обезьян изучена концентрация НА в 7 различных участках мозга: продолговатом мозгу, варолиевом мосту, среднем мозгу, гипоталамусе, хвостатых ядрах, коре центральной извилины и гиппокампа. Сопоставление с литературными данными (1—3 и др.) показало, что единственной, но выраженной видовой особенностью обезьян макак является очень высокая концентрация НА в гипоталамусе. Этот факт, а также максимальное для млекопитающих (при расчете на единицу веса тела) содержание А в надпочечниках можно связать с высокой подвижностью, активностью и эмоциональной лабильностью макак (7).

В опытах на мышах изучены некоторые советские препараты, прямо влияющие на обмен КА (рис. 2). Ни один из 3 исследованных нами ингибиторов МАО при использовании оптимальных дозировок и сроков: ипризид (ипрониазид), фелазин (фе-

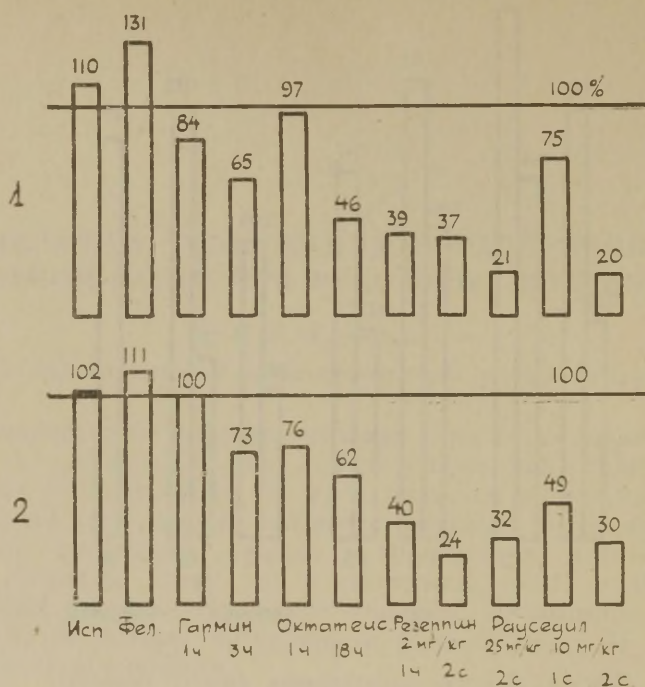


Рис. 2. Содержание норадреналина в головном мозгу при введении ингибиторов МАО и либераторов катехоламинов (в % к норме).

1 — большие полушария, 2 — ствол мозга.

нилэтилгидразин, синтезированный проф. М. Н. Щукиной) и гармин — не повышал значимо содержания НА в полушариях и стволе головного мозга. При этом угнетение МАО мозга мы подтвердили при помощи фармакологических тестов: предупреждением резерпиновой седации, потенцированием координированного моторного возбуждения, вызываемого ДОФА, и четким извращением всех эффектов резерпина при совместном введении ингибиторов МАО и ДОФА. Очевидно, угнетение МАО головного мозга в наших опытах было неполным, — хорошо известно, что повышение содержания НА происходит лишь при 85—90% угнетении фермента (8).

Изученные нами либераторы КА существенно понижали содержание НА в обоих отделах мозга. Октаменсин (аналог гуанетидина, синтезированный проф. И. Х. Фельдманом) не вызывал существенных сдвигов через 1 час после введения, но через 18 часов снижал концентрацию НА примерно на  $\frac{1}{2}$  в полушариях и на  $\frac{1}{3}$  в стволочной части. Резерпин вызывал более резкое



падение НА, которому сопутствовали выраженные фармакологические эффекты: седация, гипотермия и блефароспазм. Можно отметить практическое совпадение сдвигов, вызванных обоими препаратами резерпина: выпускаемым Харьковским научно-исследовательским химико-фармацевтическим институтом и венгерским рауседелом.

В качестве моделей острого интенсивного раздражения были применены общее однократное облучение и введение цистамина. Облучение кроликов в дозе 1200 р (9) вызывало в ранние сроки 3-фазные изменения содержания НА в головном мозгу и точно такие же сдвиги НА в селезенке и А в надпочечниках (рис. 3).

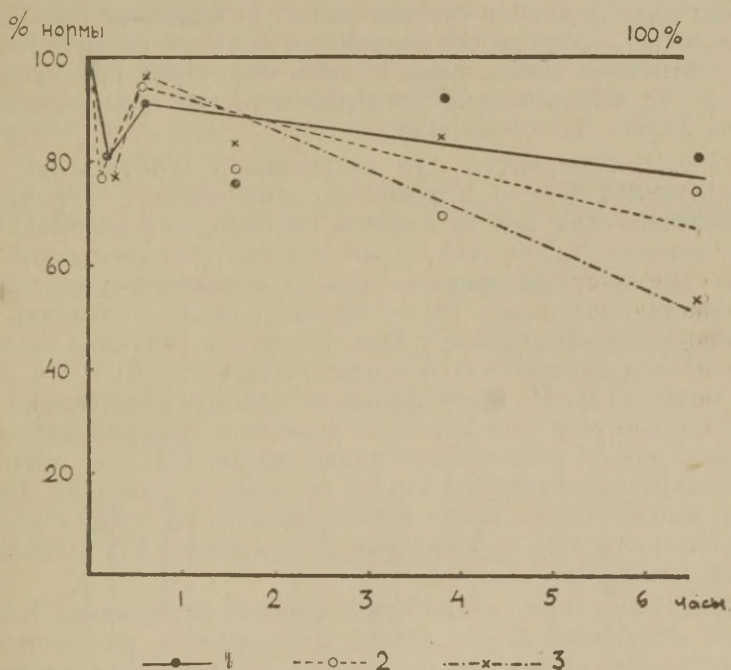


Рис. 3. Динамика содержания катехоламинов после облучения кроликов (1200 р).

1 — норадреналин головного мозга, 2 — норадреналин селезенки, 3 — адреналин надпочечников.

Цистамин, применяемый как радиопротектор и гипотензивное средство, вызывал у крыс аналогичные (по характеру, выраженности и времени развития) изменения содержания КА в больших полушариях и стволе головного мозга, а также в сердце, селезенке, тонкой кишке и надпочечниках: начальное снижение (1 мин), возврат к уровню нормы (5 мин) и постепенно разви-

вающееся повторное снижение через 3 часа (опыты проведены совместно с Л. М. Набутовской). Мы интерпретируем эти сдвиги как результат различного соотношения длительно протекающего активного освобождения КА из депо и меняющихся по интенсивности процессов биосинтеза: вначале происходит только мобилизация КА (1-я фаза), затем она временно уравнивается нарастанием синтетических процессов (2-я фаза), но постепенно развивается относительная недостаточность последних, приводящая к снижению содержания КА в органах (3-я фаза). В целом такая 3-фазная реакция свидетельствует, очевидно, об активном функционировании симпатико-адреналовой системы (САС). О правильности такой интерпретации для мозгового вещества надпочечников говорит целый ряд данных (10). О функциональном возбуждении различных нервных центров головного мозга в ранние сроки после общего облучения кроликов свидетельствуют убедительные электроэнцефалографические исследования М. Н. Ливанова (11).

Важно подчеркнуть, что интенсивное возбуждение САС с мобилизацией КА — в условиях этих опытов — развивается параллельно для всех 3 отделов системы: симпатических центров головного мозга (НА — модулятор), симпатической иннервации эффекторных органов (НА — медиатор) и мозгового вещества надпочечников (А — гормон). Можно отметить также, что при эфирном наркозе у крыс подобная динамика была установлена для содержания А в надпочечниках (10) и НА в головном мозгу (12). Наличие фазности сдвигов содержания КА — во всяком случае при изучении факторов, опосредованно вызывающих острое интенсивное раздражение САС, — требует исследования относительно полной временной динамики. При изучении только одного срока можно попасть на точку с взаимным уравниванием мобилизации и биосинтеза КА и сделать вывод об отсутствии сдвигов.

Описанная нами синхронность сдвигов содержания КА не является обязательной. Детальное исследование различных отделов головного мозга макака (работа на обезьянах проводилась совместно с Л. Ф. Семеновым) выявило разнонаправленность изменений содержания НА в определенные сроки (4—24 часа) после общего  $\gamma$ -облучения в дозе 666 р (13): снижение в гипоталамусе и увеличение в продолговатом мозгу, варолиевом мосту, среднем мозгу и хвостатых ядрах. Направленность и выраженность сдвигов содержания КА в надпочечниках и в гипоталамусе была одинаковой, что соответствует данным Vogt (1). В то же время в стволе мозга и в хвостатых ядрах реакция со стороны содержания НА была противоположной — через 4—12 часов отмечалось увеличение НА. Таким образом, катехоламиновые различия между собственно стволовой частью и гипоталамусом заключаются не только в уровне нормальной концент-

рации НА (1—3), но и в характере реакции на раздражающее воздействие. Здесь имеется четкий параллелизм с различием электрофизиологических реакций на облучение ретикулярной формации ствола и гипоталамуса (11). Наши данные заслуживают внимания и в связи с имеющимися в литературе расхождениями по вопросу о направленности сдвигов НА при функциональном возбуждении нервных центров. Если Vogt (1) при введении ряда фармакологических стимуляторов САС наблюдала снижение содержания НА в гипоталамусе, то ряд других авторов (2, 4, и др.) отметил тесный параллелизм нервного возбуждения и увеличения содержания НА в стволе головного мозга. Мы полагаем, что одной из важных причин такого расхождения может являться проведение исследований на разных зонах ЦНС. В пользу этого может свидетельствовать также то, что при электрическом раздражении гипоталамуса содержание НА в ретикулярной формации увеличивается, а в самом гипоталамусе (в целом) — снижается (13).

Третий тип воздействия — тяжелый патологический процесс — изучался на примере острой лучевой болезни, завершив-

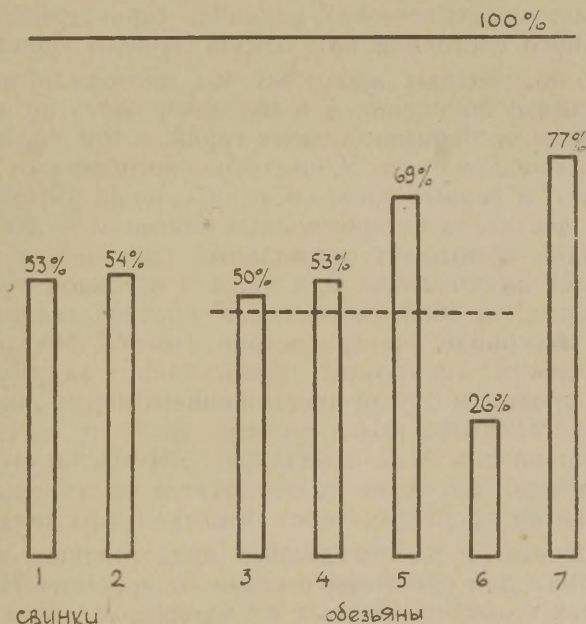


Рис. 4. Содержание норадреналина в головном мозгу животных, погибших от острой лучевой болезни (в % к норме).

Прерывистая горизонтальная линия — среднее содержание норадреналина в стволовой части мозга обезьян.  
 1 — полушария, 2 — ствол, 3 — продолговатый мозг,  
 4 — варолиев мост, 5 — средний мозг, 6 — гипоталамус,  
 7 — хвостатые ядра.



шейся летальным исходом (рис. 4). У морских свинок, погибших на 8—17-е сутки после облучения в дозе 500 р, содержание НА как в полушариях, так и в стволе мозга уменьшалось в среднем в 2 раза (данные получены совместно с Л. С. Костюковской). У обезьян макак, погибших на 6—21-е сутки после облучения в дозах 620—720 р, среднее содержание НА в стволовой части мозга снижалось примерно также в 2 раза (прерывистая линия на рис. 4). Однако степень этого снижения сильно отличалась в разных отделах ствола: если в продолговатом мозгу и варолиевом мосту концентрация НА уменьшалась в среднем на 50—47%, а в среднем мозгу — лишь на 31%, то в гипоталамусе происходило падение на 74%. Наименьшее снижение отмечалось в хвостатых ядрах (в среднем на 23%). Следовательно, и в этих условиях, когда снижение содержания КА охватывает все отделы головного мозга (и все другие изученные нами органы: сердце, селезенку, печень, тонкую кишку и надпочечники), выраженность изменений может оказаться различной. Внимание привлекает особая тяжесть сдвигов, происходивших в гипоталамусе — высшем центре симпатических регуляций. Естественно предположить, что это может иметь существенное значение для грубого нарушения гомеостатических реакций, характерного для предтерминального состояния при острой лучевой болезни.

У всех подопытных животных мы проводили исследования и на А. Однако появления А в головном мозгу не наблюдалось ни в одной из экспериментальных серий, в том числе и при резкой гиперадrenalинемии. У кроликов, погибших от «рентгеновского шока», в первые часы после облучения (9) концентрация А в крови достигала экстремальных значений — 200 мкг/л (что на 3 порядка превышает нормальный уровень), в ряде тканей наблюдалась аккумуляция А и лишь в головном мозгу гормон, как и в норме, не обнаруживался. У морских свинок и обезьян, погибших в периоде разгара острой лучевой болезни с резким геморрагическим синдромом, происходила аккумуляция А в сердце до уровня, в 3 раза превышавшего норму, но ни в одном из отделов головного мозга (в том числе и в гипоталамусе обезьян) появления А не отмечалось. Это согласуется с данными литературы, что А не синтезируется в головном мозгу и практически не проникает через гемато-энцефалический барьер.

Приведенные в работе данные представляют дополнительный материал для суждения о связи содержания НА в различных отделах головного мозга с их функциональным состоянием. Особый интерес представляет фазность сдвигов содержания НА при острых опосредованных воздействиях и возможность разнонаправленных изменений в гипоталамусе и отделах ствола. Исследования КА ЦНС должны проводиться и интерпретироваться с обязательным учетом временной динамики и специфики различных нервных зон.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Vogt M., J. Physiol., **123**, 3, 451, 1954.
2. Carlsson A., Pharmacol. Rev., **11**, 2, p. 2, 490, 1959; Bertler A., Acta physiol. Scand., **51**, 1, 75, 1961.
3. Утевский А. М., Осинская В. О., 3-я Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы, Ереван, 495, 1963.
4. Brodie B. B., Costa E., In: Monoamines et système nerveux central, Symp. Bel-Air, Genève, 13, 1962.
5. Marley E., Adv. Pharmacol., **3**, 167, 1964.
6. Осинская В. О., Биохимия, **22**, 3, 537, 1957.
7. Кулинский В. И., Укр. біохім. ж., **36**, 3, 388, 1964.
8. Gey K. F., Pletscher A., J. Neurochem., **6**, 3, 239, 1961.
9. Кулинский В. И., Канд. дисс., Харьков, 1961.
10. Кулинский В. И., Материалы I съезда эндокринологов УССР, Харьков, 244, 1965.
11. Ливанов М. П., Некоторые проблемы действия ионизирующей радиации на нервную систему, Москва, 1962.
12. Митишов М. И., Шаляпина В. Г., Ракицкая В. В., 4-я Всесоюзная конф. по биохимии нервной системы, Тарту, 1966.
13. Кулинский В. И., Радиобиология, **5**, 4, 494, 1965.
14. Могилевский А. Я., Леонова Н. Н., Материалы I съезда эндокринологов УССР, Харьков, 324, 1965.

## ДЕЙСТВИЕ ГАМК НА УРОВЕНЬ КАТЕХОЛАМИНОВ В МОЗГУ

Н. А. Есаян

Институт биохимии АН Арм. ССР, Ереван

Наличие значительного количества  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в мозгу (1, 2) дает основание думать о ее определенной роли в нейронной деятельности. Как известно, ГАМК обладает тормозящим действием. Однако пока трудно утверждать, является ли она медиатором тормозного процесса или этот эффект возникает через вовлечение в сферу ее действия других веществ. Существование тормозных нейронов в ЦНС млекопитающих в настоящее время не встречает возражений, хотя до сих пор остается неясной химическая природа медиатора, выделяемого окончаниями указанных нейронов.

В ранних работах Баземора и сотр. (3) и Робертса (4) тормозной эффект фактора I и мозговых экстрактов был целиком отнесен за счет ГАМК. Эдвардс и Каффлер (5) на рецепторе растяжения речного рака получили аналогичное блокирование возникновения импульсов в чувствительных нейронах от ГАМК и при раздражении тормозного нерва. Однако позднее этими же авторами (6, 7) было показано, что и другие аминокислоты оказывают тормозящее действие на рецептор растяжения речного рака. В экспериментах Мак Гира и сотр. (8) норадреналин (НА) проявлял такое же ингибирующее действие, как и ГАМК, в то время как дофамин (ДА) вызывал еще более выраженный эффект. По данным Марраззи (9), серотонин, адреналин (А), ГАМК и НА тормозят передачу импульсов в центральных синапсах. В дальнейшем Флори и Бидерман (10) высказали мысль, что тормозным медиатором, даже в рецепторе растяжения, являются какие-то другие вещества, но не ГАМК. Эта точка зрения еще находит подтверждение в исследованиях по субцеллюлярному распределению ГАМК (11), согласно которым ГАМК, как и все аминокислоты мозга (активны они в отношении нейронов или нет), равномерно распределена во всех субцеллюлярных фракциях.

С другой стороны, некоторые факты говорят в пользу того,



что ГАМК является медиатором; так, например, декарбоксилаза глутаминовой кислоты была обнаружена Салганикоффом и Де Робертисом (12) в синапсомной фракции; далее Сано и Робертс (13) показали, что фракция нервных окончаний активно поглощает ГАМК, и, наконец, работами Крнджевича (14) было установлено, что ее незначительные количества ( $10^{-5}$  М) подавляют электрическую активность отдельных корковых нейронов. Однако большое количество ГАМК в мозгу, ее сравнительно низкая обмениваемость, отсутствие в ряде случаев корреляции между количеством ГАМК и функциональной активностью мозга, а также отсутствие ее в синаптических пузырьках не согласуется с ее медиаторной функцией.

В связи с возможным модулированием синаптической деятельности под действием ГАМК посредством вовлечения других веществ представляло интерес изучить ее действие на различные КА как на одни из синаптически активные вещества мозга. Последние, согласно наблюдениям Марраззи и сотр. (9), Фельдберга и Шервуда (15) и недавним ионтофоретическим исследованиям Крнджевича и Филлиса (16), обладают также ингибиторной активностью в отношении центральных синапсов. С этой целью мы предприняли исследования для изучения действия ГАМК на уровень катехоламинов (КА) как в целом мозгу, так и в его различных отделах. Для выяснения вопроса специфичности действия, ГАМК в отношении КА мозга мы определяли количество НА и А в сердце и селезенке. Был изучен также уровень НА в мозгу в условиях повышенного содержания эндогенной ГАМК, вызванного аминоксикусной кислотой (АОУК).

#### Материал и методы исследования

Опыты были поставлены на белых крысах весом 120—150 г. В опытах *in vivo* ГАМК в количестве 500 мкг на 100 г живого веса вводили интраперитонеально в 0,25 мл физиологического раствора. Смесь нейтрализовали до pH 7,0. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объеме. Уровень эндогенной ГАМК повышали путем интраперитонеального введения АОУК в количестве 37,5 мкг/г живого веса в 0,1 мл физиологического раствора. В опытах *in vitro* срезы гипоталамической области и полосатого тела в количестве 100 мг и срезы коры головного мозга в количестве 200 мг инкубировали в 3 мл фосфатного буфера pH 7,4, имеющего следующий состав в мкмольях: NaCl — 98, KCl — 27;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 1,2;  $KH_2PO_4$  — 4;  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  — 17,5; глюкоза — 10. Инкубацию проводили в течение 45 мин при 37°C. ДА, НА и А определяли спектрофотометрическим методом на спектрофлуорометре Farrand optical Co, после очистки на ионообменной смоле — ДАУЕКС 50  $\times$  4 (200—400) H<sup>+</sup>, ДА определяли по методу Карлсона и Уалдека (17), несколько модифицированному нами, а НА и А — по Бертлеру, Карлсону и Розенгрону (18), дифференциацию НА и А производили на основании их разной спектральной характеристики. ГАМК в мозгу определяли электрофоретическим методом. Количество КА выражено в мкг/г свежей ткани.

## Результаты исследования

Действие интраперитонеального введения  
ГАМК на уровень ДА, НА и А в мозгу и других  
тканях

Определение уровня ДА, НА и А в целом мозгу крыс через 20 и 60 мин после интраперитонеального введения 500 мкг ГАМК на 100 г живого веса (табл. 1 и 2) показало статистически достоверное понижение уровня НА (приблизительно до 75% контрольного уровня) и незначительное повышение количества А в мозгу, в то время как уровень ДА не подвергался особым изменениям. Через два часа после введения ГАМК понижения уровня НА больше не отмечалось.

Таблица 1

Действие интраперитонеального введения ГАМК на уровень ДА, НА и А  
в мозгу крыс через 20 мин после введения

	ДА	НА	А
Контроль	$0,512 \pm 0,035$ (10) *	$0,407 \pm 0,035$ (8)	$0,011 \pm 0,007$ (8)
ГАМК	$0,498 \pm 0,026$ $p < 0,2$ (10)	$0,309 \pm 0,015$ $p < 0,01$ (10)	$0,034 \pm 0,013$ $p < 0,2$ (10)

\* В скобках — количество экспериментов.

Таблица 2

Действие интраперитонеального введения ГАМК на уровень ДА, НА и А  
в мозгу крыс через 60 мин после введения

	ДА	НА	А
Контроль	$0,50 \pm 0,034$ (7)	$0,356 \pm 0,045$ (9)	$0,028 \pm 0,009$ (9)
ГАМК	$0,52 \pm 0,024$ (7)	$0,273 \pm 0,05$ $p < 0,05$ (14)	$0,038 \pm 0,004$ $p < 0,8$ (14)

Как видно из табл. 3, количество НА и А в разных отделах мозга, а именно, в гипоталамической области, полушариях, варолиевом мосту вместе с продолговатым мозгом, через 20 мин

Таблица 3

Действие интраперитонеального введения ГАМК на уровень НА в отдельных частях мозга крыс через 20 и 60 мин после введения

	Полушарии мозга	Гипоталамическ. область	Варолиев мост + продолг. мозг
Контроль	$0,227 \pm 0,010$ (21)	$1,200 \pm 0,066$ (20)	$0,315 \pm 0,017$ (20)
Через 20 мин	$0,234 \pm 0,012$ (10)	$0,910 \pm 0,05$ (10) $p < 0,01$	$0,324 \pm 0,016$ (10)
Через 60 мин	$0,187 \pm 0,012$ (7) $p < 0,05$	$1,105 \pm 0,07$ (10)	$0,266 \pm 0,018$ (8) $p < 0,05$

Таблица 4

Действие интраперитонеального введения ГАМК на уровень НА и А в селезенке крыс через 20 мин после введения

	НА	А
Контроль	$0,392 \pm 0,07$ (7)	$0,056 \pm 0,0019$ (7)
ГАМК	$0,274 \pm 0,06$ $p < 0,05$ (15)	$0,107 \pm 0,018$ $p < 0,01$ (15)

Таблица 5

Действие интраперитонеального введения ГАМК на уровень НА и А в сердце крыс через 20 мин после введения

	НА	А
Контроль	$0,913 \pm 0,065$ (8)	$0,119 \pm 0,07$ (8)
ГАМК	$0,556 \pm 0,07$ $p < 0,01$ (10)	$0,098 \pm 0,05$ $p < 0,7$ (10)



после введения ГАМК понижается в гипоталамической области, в то время как в двух остальных изучаемых отделах мозга этот эффект наблюдается только через 60 мин после введения.

Изучение уровня НА и А в селезенке и сердце крыс после интраперитонеального введения ГАМК показало статистически достоверное понижение количества НА в обоих органах (табл. 4 и 5), в то время как содержание А в селезенке возрастает вдвое, а в сердце не подвергается заметным изменениям.

Действие ГАМК на содержание НА и А в срезах гипоталамической области и коры головного мозга и ДА в срезах области полосатого тела

Разные количества ГАМК, добавленные к срезам коры головного мозга, вызывали различное действие на уровень НА и А (табл. 6 и 7). Малые количества ГАМК (1 мкг/мл) не вызывали никаких сдвигов в содержании ГАМК в срезах коры головного мозга, в то время как большие концентрации (10 и 300 мкг/мл) вызывали статистически достоверное понижение количества НА в срезах. Интересно отметить, что большие количества ГАМК почти не действовали на уровень НА в срезах.

Таблица 6

Действие ГАМК на высвобождение НА и А из срезов коры больших полушарий мозга

	НА	А
Контроль	$0,177 \pm 0,045$ (36)	$0,039 \pm 0,041$ (36)
1 мкг/мл	$0,162 \pm 0,087$ $p < 0,7$ (24)	$0,081 \pm 0,047$ $p < 0,05$ (24)
10 мкг/мл	$0,124 \pm 0,06$ $p < 0,05$ (24)	$0,060 \pm 0,046$ $p < 0,04$ (24)
300 мкг/мл	$0,124 \pm 0,042$ $p < 0,01$ (16)	$0,038 \pm 0,013$ $p < 0,9$ (16)
1 мг/мл	$0,159 \pm 0,01$ $p < 0,7$ (6)	$0,037 \pm 0,015$ $p < 0,9$ (6)

Добавление 300 мкг/мл ГАМК к инкубационной среде в опытах на срезах гипоталамической области также привело к статистически достоверному понижению количества НА.

Таблица 7

Действие ГАМК на высвобождение НА и А и срезов гипоталамической области

	НА	А
Контроль	$0,708 \pm 0,05$ (9)	$0,143 \pm 0,05$ (9)
300 мкг/мл	$0,477 \pm 0,06$ $p < 0,01$ (15)	$0,203 \pm 0,06$ $p < 0,02$ (15)

Интересно отметить, что под действием ГАМК уровень НА в корковых и гипоталамических срезах понижается до 70 и 63% контрольного уровня.

Добавление 150—300 мкг/мл ГАМК к инкубационной среде не изменило содержания ДА в срезах области полосатого тела, где содержится наибольшее количество ДА (табл. 8).

Таблица 8

Действие ГАМК на содержание ДА в срезах области полосатого тела

Контроль	ГАМК
$2,13 \pm 0,05$ (5)	$2,05 \pm 0,03$ (5)

Действие АОУК на уровень НА в мозгу

Работами Уаллача (19) установлено, что АОУК повышает уровень эндогенной ГАМК путем торможения ее трансаминирования. Интересно было выяснить действие повышенного уровня эндогенной ГАМК на НА мозга. Работами Бакстера и Робертса (20) и Куриама и др. (21) было показано, что максимальное повышение уровня ГАМК в мозгу происходит через 6 часов после интраперитонеального введения АОУК. Изучая количество НА мозга через разные промежутки времени, нами было установлено, что через 6 часов после введения ГАМК оно подвергается статистически достоверному понижению, достигая 74% контрольного уровня (табл. 9). В то же время содержание ГАМК в мозгу повышается в 3 раза по сравнению с нормой.

Действие АОУК на уровень НА в мозгу

Контроль	АОУК
$0,390 \pm 0,014$ (10)	$0,290 \pm 0,012$ $p < 0,01$ (15)

## Обсуждение результатов

Полученные нами данные позволяют заключить, что интраперитонеальное введение ГАМК вызывает статистически достоверное понижение уровня НА в мозгу и в других тканях. Этот эффект отмечается начиная с 20 мин после ее введения и исчезает через 2 часа. Несмотря на то, что вопрос о проникновении ГАМК через гемато-энцефалический барьер до сих пор остается спорным, хорошо известно, что ее парентеральное введение оказывает центральное действие. Некоторые данные, полученные в нашем институте, говорят в пользу проникновения ГАМК через гемато-энцефалический барьер (22). Интересно, что степень понижения НА в мозгу почти одинакова в опытах с АОУК, где через 6 часов после ее введения уровень ГАМК повышается в три раза и после интраперитонеального введения 500 мкг ГАМК, где даже в случае полного проникновения уровень ее в мозгу поднимался бы незначительно. Почти такое же понижение отмечается и в опытах с добавлением ГАМК к срезам. На основании этого мы считаем, что лишь часть мозгового НА подлежит высвобождению под действием ГАМК и что степень понижения количества НА в мозгу не находится в прямой зависимости от концентрации введенной ГАМК.

Полученные результаты наводят на мысль о связи между ингибирующим действием ГАМК и понижением уровня НА в мозгу. В настоящее время не имеется прямых указаний относительно медиаторной функции НА и ГАМК в мозгу. Однако разлитое торможение, вызванное путем поверхностной стимуляции корковых нейронов, а также ингибирующее действие коркового синаптосомного экстракта на отдельные корковые нейроны, полученные в исследованиях Крнджевич и сотр. (23) и Крнджевич и Уиттэкер (24), были приписаны ГАМК. Эти данные говорят в пользу того, что ГАМК является тормозным медиатором корковых нейронов. С другой стороны, большие концентрации ГАМК в мозгу и ее медленная обмениваемость по сравнению с другими синаптически активными веществами (25) наряду с ее отсутствием в синаптических пузырьках (11) не говорят в пользу медиаторной функции ГАМК.



По мнению Робертса и сотр. (26), ГАМК модулирует нейронную возбудимость через высвобождение тормозных и возбуждающих медиаторов из пресинаптических окончаний, при этом важное значение придается балансу между системами ГАМК — ацетилхолин. Полученные нами данные позволяют заключить, что НА тоже может быть включен в эту систему и играть роль в проявлении ингибирующего эффекта ГАМК. К сожалению, роль НА в мозгу нельзя считать окончательно установленной. Его присутствие в синаптических пузырьках фракций нервных окончаний мозговых гомогенатов (27—30) и выявление флюоресцентных пятен в отделах мозга, богатых НА (31), указывают на медиаторную функцию НА в центральной нервной системе. Наличие АХ лишь в малой части мозговых синапсов, от 0 до 25% в разных отделах мозга (11), говорит о том, что возбуждение в остальных синапсах осуществляется через другие медиаторы. Повышение уровня НА в мозгу за счет его предшественников (32, 33) и под действием ингибиторов МАО (34, 35) сопровождается проявлением центрального возбуждения. Интравенное введение А вызывает электрофизиологическую картину возбуждения (36). С другой стороны, при интракаротидном и интрацеребральном введении НА вызывает тормозной эффект (9 и 15). Эти данные подтверждены ионтофоретическими исследованиями Крнджевича и Филлиса (16).

Понижение уровня НА и в других органах, кроме мозга, показывает, что этот эффект не специфичен для мозговой ткани. Несмотря на это в опытах, где содержание НА было определено в отдельных участках мозга, понижение его наблюдалось в первую очередь в гипоталамической области. Результаты опытов *in vitro* показали, что ГАМК оказывает прямое действие на НА. Хорошо известно действие ГАМК на проницаемость мембран. Работы нашего института показали более широкое действие ГАМК на процессы проницаемости (39). Высвобождение НА из мозговой и других тканей может быть приписано ее действию на разные мембраны — клеточные и синаптические пузырьки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts E., Frankel S., J. Biol. Chem., 187, 55, 1950.
2. Awapara J., Landua A. J., Fuerst R., Seal B., J. Biol. Chem., 187, 35, 1950.
3. Bazemore A., Elliott K. A. C., Florey E., Nature (London), 178, 1052, 1956.
4. Roberts E., In: Ultrastructure and Metabolism of the Nervous System, XL Research Publications A. R. N. M. D., 1962.
5. Edwards C., Kuffler S. W., Feder. Proc., 16, 34, 1957.
6. Edwards C., Kuffler S. W., J. Neurochem., 4, 19, 1959.
7. Bazemore A. W., Elliott K. A. C., Florey E., J. Neurochem., 1, 334, 1957.
8. Mc Geer E. G., Mc Geer P. L., Mc Lennan A., J. Neurochem., 8, 36, 1961.

9. Marrazzi S. A., Hart R. E., Rodriguez J. N., *Science*, **127**, 284, 1958.
10. Florey E., Biederman M. A., *J. Gen. Physiol.*, **43**, 518, 1960.
11. Whittaker V. P., *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **15**, 39, 1965.
12. Salganicoff L., De Robertis E., *Life Sci.*, **2**, 85, 1963.
13. Sano K., Roberts E., *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 489, 1963.
14. Krnjevic K., *Int. Rev. Neurobiol.*, **7**, 41, 1964.
15. Feldberg W., Sherwood S. L., *J. Physiol.*, **123**, 148, 1954.
16. Krnjevic K., Phillis J. W., *J. Physiol.*, **165**, 274, 1963.
17. Carlsson A., Waldeck B., *Acta physiol. scand.*, **44**, 293, 1958.
18. Bertler A., Carlsson A., Rosengren E., *Acta physiol. scand.*, **44**, 278, 1958.
19. Wallach D. B., *Biochem. Pharmacol.*, **5**, 166, 1960.
20. Baxter C. C., Roberts E., *J. Biol. Chem.*, **236**, 3287, 1961.
21. Kuriyama K., Roberts E., Rubinstein M. K., *Biochem. Pharmacol.*, 1965 (in press).
22. Бунятян Г. Х., Казарян Б. А., Карагезян К. Г., Гулян Э. А., *ДАН Арм. ССР*, **XL**, (5), 289, 1965.
23. Krnjevic K., Randic M., Straughan D., *Nature (London)*, **201**, 1294, 1964.
24. Krnjevic K., Whittaker V. P., *Nature*, **207**, 4992, 85, 1965.
25. Roberts E., *Nutrition Reviews*, **21**, 161, 1963.
26. Roberts E., Rothstein M., Baxter C. F., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **97**, 796, 1958.
27. Crusciel T. L., In: *Ciba Foundation Symposia on Adrenergic Mechanisms* (Ed. Vane Wolstenholme and O'Connor), p. 539, London, Churchill, 1960.
28. Lavery R., Michelsen I. A., Sharman D. F., Whittaker V. P., *Brit. J. Pharmacol.*, **21**, 482, 1963.
29. Levi R., Maynert E. W., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 615, 1964.
30. Potter L. T., Axelrod J., *Nature (London)*, **194**, 581, 1962.
31. Falck B., In: *Biogenic Amines* (Ed. Himwich and Himwich), p. 28, Elsevier, Amsterdam, 1964.
32. Carlsson A., Lindqvist M., Magnussen T., *Nature (London)*, **180**, 1200, 1957.
33. Carlsson A., *Pharmacol. Rev.*, **490**, 1959.
34. Brodie B. B., Spector S., Shore P. A., *Pharm. Rev.*, **11**, 548, 1958.
35. Spector S., Shore P. A., Brodie B. B., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **128**, 15, 1960.
36. Tauc L., Gerchenfeld H. M., *J. Physiol. (Paris)*, **54** (2), 416, 1962.
37. Randic M., Simonoff R., Straughan D. W., *Experimental Neurology*, **9**, (3), 236, 1964.
38. Buniatian H. Ch., In: *Studies in the Role of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Carbohydrate Metabolism*, Yerevan, 1961.

## ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ В КРОВИ У БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ

О. З. Голубков

Клиника психиатрии и кафедра физиологии Алтайского медицинского  
института, Барнаул

Исследование функционального состояния головного мозга больных эпилепсией имеет для клиники не только теоретический, но и большой практический интерес, так как определяет большинство лечебных мер при эпилепсии. Несмотря на многочисленные исследования, по этому вопросу имеются разноречивые представления. Даже при хорошо изученной судорожной форме эпилепсии, одни исследователи (1—11) находили, что судорожный припадок развивается при тормозном состоянии коры и возбуждении подкорковых образований, другие (12—16) связывали развитие припадков с повышением возбудимости коры головного мозга. Исследователи в клинике (17—23) находили, что у больных с судорожными припадками возбудимость мозга, в частности коры, может резко повышаться; однако многие авторы (24—31) отмечали торможение корковой деятельности, особенно в предсудорожном периоде. Динамическое исследование больных с преимущественно судорожными формами припадков показало, что для разных периодов болезни (межприпадочного, предприпадочного и постприпадочного) характерны различные функциональные изменения в корково-подкорковых образованиях головного мозга (32).

Особый интерес представляет изучение внутренней природы различных функциональных состояний ЦНС. Как подчеркивает А. В. Палладин (33), изучение закономерностей обмена веществ, которые могут обуславливать различные функциональные состояния ЦНС, представляет важнейшую задачу современной биохимии нервной системы. При экспериментальном судорожном припадке в головном мозгу находили сложные изменения метаболизма (усиление белкового обмена с накоплением ам-



миака; увеличение уровня молочной и пировиноградной кислоты в связи с распадом глюкозы; повышение содержания неорганического фосфата и уменьшение фосфокреатина; уменьшение содержания связанного ацетилхолина (АХ); увеличение количества внутриклеточного натрия и уменьшение количества внутриклеточного калия; увеличение потребления кислорода и др. (31, 35).

Рассматривая последовательность биохимических сдвигов при экспериментальном судорожном припадке, можно выделить главные, или первичные и вторичные сдвиги. Так, изменения содержания АХ обнаруживаются уже в первые секунды после начала припадка, а распад фосфорных соединений появляется через 15—20 секунд, изменения содержания гликогена — к концу припадка. Можно полагать, что первичные химические сдвиги в обмене при судорожных припадках относятся к обмену нейромедиаторов и, в частности, к АХ.

Задачу настоящей работы составляет параллельное исследование, в динамике, в различные периоды (межприпадочном, предсудорожном и послесудорожном) взаимоотношений в крови серотонина, АХ, активности ХЭ и особенностей функционального состояния головного мозга у больных с судорожными формами эпилепсии.

Работ по изучению взаимоотношений серотонина, АХ и ХЭ в крови больных эпилепсией в доступной нам литературе мы не нашли, между тем этот вопрос несомненно представляет большой интерес, так как эти биологически активные вещества играют важную роль в деятельности мозга и сдвиги в обмене нейромедиаторов могут участвовать в интимном механизме развития различных функциональных изменений в ЦНС.

Для исследования функционального состояния головного мозга использовался импульсный электронный стимулятор (ИСЭ-01); проводилось двустороннее исследование реобазы и хронаксии оптического, вестибуляторного аппаратов и сгибателей пальцев кисти. Количество АХ в крови определялось по методу Корстена в модификации Х. С. Хамитова (36), активность ХЭ — по методике Т. В. Правдич-Неминской (37). Определение содержания серотонина в крови проводилось по способу Далглиш То и Уэрк (38). Нас интересовали не столько абсолютные цифры электровозбудимости анализаторов и содержания нейромедиаторов в крови, сколько соотношение этих показателей при параллельном исследовании и их динамика в различные периоды болезни.

Исследовано 20 больных эпилепсией (12 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 18 до 38 лет с различной давностью (от 2 до 37 лет) эпилептического процесса. В клинике у всех больных наблюдались типичные большие судорожные припадки различной частоты, которые у части больных сочетались с abortивными

## Изменение функционального состояния ЦНС и содержания некоторых нейромедиаторов в крови у больных судорожными формами эпилепсии в различные периоды болезни

Функциональное состояние анализаторов и содержание нейромедиаторов в крови в различные периоды болезни	Оптический аппарат		Вестибулярный аппарат		Сгибатели пальцев кисти		Система АХ—ХЭ		Содержание серотонина
	реобазы в вольтах	хронаксия в м сек.	реобазы в вольтах	хронаксия в м сек.	реобазы в вольтах	хронаксия в м сек.	содержание АХ	активность ХЭ	
Межприпадочный период	высокая	несколько удлинена	Без отклонения от средних величин этих показателей у здоровых лиц		низкая	укорочена	повышено	повышена	понижено
Предсудорожный период	понижается	удлиняется	понижается	укорачивается	понижается	укорачивается	повышается	понижается	значительно повышается
Непосредственно перед судорожным припадком	повышается	значительно удлинена	понижена	укорочена	понижена	короткая и на этом фоне колебания	повышено	понижена и неустойчива	значительно повышено
После судорожного припадка	понижается	укорачивается	повышена	удлинена	повышена	удлинена	понижается	повышается до нормальных цифр	понижается (в 5—6 раз)

судорожными и реже малыми припадками. Частота припадков — от нескольких в год (6—8), в месяц (2—3) до нескольких в неделю. В межприпадочный период отмечались хронические изменения интеллекта и характера различной выраженности, редкие непродолжительные дисфории и сумеречные расстройства сознания.

Все больные исследовались многократно на протяжении длительного времени (от 6 месяцев до 3 лет) в условиях стационара и амбулатории, что составило в сумме 640 опытных дней, а включая двустороннее исследование трех анализаторов, проведено 3840 исследований. 264 опыта сделано при исследовании в крови серотонина, АХ и активности ХЭ.

Исследование выявило у больных с большими судорожными припадками закономерные изменения функционального состояния головного мозга и нейромедиаторов в крови для межприпадочного, предсудорожного и постприпадочного периодов.

В таблице представлены данные изменения функционального состояния ЦНС и содержания некоторых нейромедиаторов в крови у больных в различные периоды эпилептического процесса. Из таблицы видно, что в межприпадочном периоде в оптическом аппарате выявлялось незначительное понижение гальванической возбудимости и скорости развития возбуждения; в вестибулярном и периферическом двигательном (сгибатели пальцев кисти) аппаратах не обнаруживалось резких отклонений от средних величин этих показателей у контрольной группы здоровых лиц; в крови содержание АХ и активность ХЭ были несколько повышены, а содержание серотонина значительно понижено. В предсудорожном периоде (от нескольких дней до нескольких часов до судорожного припадка) в оптическом аппарате возрастала гальваническая возбудимость, но понижалась скорость развития возбуждения; вестибулярная возбудимость повышалась незначительно, а скорость развития возбуждения возрастала; значительно возрастала гальваническая возбудимость сгибателей пальцев кисти, скорость возбуждения при этом повышалась; в крови содержание АХ оставалось повышенным, а активность ХЭ понижалась; количество серотонина возрастало в 2—3 раза.

Непосредственно перед судорожным припадком (за 30—10 минут до пароксизма) в оптическом аппарате гальваническая возбудимость и скорость возбуждения значительно понижались; в вестибулярном аппарате и сгибателях пальцев кисти гальваническая возбудимость и скорость развития возбуждения еще более повышались; в крови содержание АХ было повышено и наблюдались понижение и неустойчивость активности ХЭ, содержание серотонина увеличивалось в 2—5 раз по сравнению с межприпадочным периодом. Вскоре после судорожного припадка (через 10—20 минут после пароксизма) в оптическом



аппарате гальваническая возбудимость и скорость возникновения возбуждения возрастали; в вестибулярном и периферическом двигательном аппаратах гальваническая возбудимость и скорость развития возбуждения значительно понижались; в крови уменьшалось содержание АХ и повышалась до нормальных цифр активность ХЭ; содержание серотонина снижалось в 5—6 раз.

Головной мозг в своей деятельности выступает как единое целое, но при этом единстве имеет место глубокая дифференцированность роли различных мозговых структур, которые составляют отдельные компоненты сложной мозговой деятельности. Различные мозговые структуры ведут себя по-разному. Изучая вестибулярную и периферическую двигательную электровозбудимость по двигательному безусловному рефлексу, можно полагать, что мы получаем представление преимущественно о функциональном состоянии подкорковых двигательных образований. Оптическую структуру в сравнении с вестибулярным и периферическим двигательными аппаратами, считают более кортиколизированной, поэтому эти же параметры (реобазис и хронаксия) оптического аппарата определяются преимущественно функциональным состоянием коркового звена зрительного анализатора (39—42), хотя, несомненно, большое значение имеют в этой функции и подкорковые структуры (43).

Изменения физиологических параметров мозговых структур при приближении большого судорожного припадка выражались в повышении гальванической возбудимости и скорости развития возбуждения в вестибулярном аппарате и сгибателях пальцев кисти, что, по-видимому, отражало возбуждение и повышение лабильности в подкорковых структурах головного мозга. В оптической структуре при этом повышалась гальваническая возбудимость и снижалась скорость развития возбуждения, что свидетельствовало о повышении возбудимости, общей тонизированности коркового звена зрительного анализатора и снижении в нем лабильности. Перед судорожным припадком, на фоне дальнейшего повышения возбудимости в подкорковых образованиях, резко снижались возбудимость и скорость возбуждения в оптическом аппарате. Последнее, по-видимому, свидетельствовало о развитии торможения и дальнейшем снижении лабильности в корковых клетках зрительного анализатора. Параллельно с этими изменениями функционального состояния в корково-подкорковых структурах головного мозга, в крови обнаруживалось повышение содержания АХ и понижение и неустойчивость активности ХЭ; особенно значительно возрастало количество серотонина (по сравнению с межприпадочным периодом в 2—5 раз).

Такое нарушение функционального состояния корково-подкорковых образований, проявляющееся в предсудорожном периоде, может обуславливаться изменениями в холино- и серо-

тонинореактивных структурах головного мозга. Во взаимоотношении нейромедиаторов крови больных предсудорожного периода и непосредственно перед припадком наблюдалось значительное увеличение количества серотонина. Это, по-видимому, обуславливалось повышением тонуса серотонинореактивных структур мозга. Считают, что гиперпродукция серотонина ведет к подавлению активности ХЭ в головном мозгу (44), и наблюдавшееся у больных понижение активности ХЭ могло быть связано с увеличением продукции серотонина. Одновременное повышение содержания АХ в крови больных могло обуславливаться как угнетающим действием на активность ХЭ серотонина, так и возбуждением холинореактивных структур мозга, которые обнаруживаются в различных областях мозга: коре, таламусе и оральных отделах среднего мозга.

Возбуждение холинореактивных структур таламуса и среднего мозга могло обуславливать повышение тонуса в центре субординационных электротонических влияний на нервно-мышечный аппарат, в частности, сгибателей пальцев кисти, в которых перед припадком наступало резкое понижение реобазы и укорочение хронаксии.

При определении вестибулярной электровозбудимости считают, что основным местом действия тока являются вестибулярные ядра варолиева моста. Локализацию серотонинореактивных структур относят к стволовой ретикулярной формации (каудальной части среднего мозга и области варолиева моста, 46). Возможно, что повышение гальванической возбудимости и скорости возбуждения в вестибулярном аппарате обуславливалось активацией серотонинореактивных структур, откуда активирующие влияния поступали к вестибулярным ядрам варолиева моста.

Изменения физиологических параметров оптического аппарата в предсудорожном периоде и непосредственно перед припадком можно объяснить тем, что гиперпродукция АХ и серотонина при пониженной активности ХЭ приводила к такому повышению возбудимости холинореактивных структур, при котором, как полагают Химвич и Ринальди (45), Р. Ю. Ильюченко (46), наступает торможение со снижением физиологической лабильности корковых клеток мозга.

В оптическом аппарате в предсудорожном периоде вначале падала лабильность (удлинялась хронаксия), но еще была высока гальваническая возбудимость, а перед припадком нарастали тормозные явления — падала гальваническая возбудимость и скорость развития возбуждения, что являлось следствием истощения функциональной работоспособности клеток оптической системы под влиянием нараставшего повышения возбудимости холино- и, особенно, серотонинореактивных структур мозга.

После судорожного припадка понижение тонуса в холино- и



серотонинореактивных структурах мозга (содержание АХ и серотонина оказывалось пониженным, а активность ХЭ повышалась) выступало параллельно с понижением тонуса в центре субординационных электротонических влияний и вестибулярных ядрах (понижалась электровозбудимость в вестибулярном аппарате и, особенно, в сгибателях пальцев кисти).

Полученные данные лабораторного изучения больных позволяют увязать некоторые изменения функционального состояния головного мозга с биологически активными химическими превращениями в крови, которые, как полагают, могут отражать подобные изменения в ЦНС (34, 47).

Закономерные для различных периодов изменения во взаимоотношении нейромедиаторов крови больных дают основание полагать, что серотонин, АХ и ХЭ играют существенную роль в генезе тех функциональных изменений в ЦНС, которые обуславливают «судорожную готовность» головного мозга. Особенно значительные сдвиги в содержании серотонина позволяют предположить, что в нервной системе больных первично наступает повышение тонуса серотонинореактивных структур, которые, как показано в исследованиях Р. Ю. Ильюченка (46), локализуются в каудальных отделах ретикулярной формации ствола мозга, и уже отсюда активирующие влияния по механизмам переключения импульсов могли возбуждать холинэргические нейроны вышележащих отделов мозга (оральных отделов мезенцефалона, таламуса и коры).

Помимо теоретического, эти данные имеют практический интерес, учитывая, что целенаправленное лечебное влияние на взаимоотношение нейромедиаторных систем позволит изменять в нужном направлении нарушенное функционирование ЦНС.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Павлов И. П., Полное собрание сочинений, III, 1, 223, 1951.
2. Павлов И. П., Полное собрание сочинений, IV, 336, 1951.
3. Сперанский А. Д., Эпилептический приступ, М.—Л., 1932.
4. Сперанский А. Д., В кн.: Элементы построения теории и медицины, М., 1935.
5. Галкин В. С., Архив биол. наук, 31, 6, 544, 1931.
6. Галкин В. С., Архив биол. наук, 32, 2, 142, 1932.
7. Галкин В. С., Руководство по неврологии, Л., 6, 310, 1960.
8. Долин А. О., Архив биол. наук, 54, 1, 32, 1939.
9. Данилов И. В., Эксперимент. эпилептиформные гиперкинезы, Л., 1963.
10. Семиохина А. Ф., Сб.: Проблема эпилепсии, М., 259, 1959.
11. Котляр Б. И., Сб.: Научные доклады высшей школы. Биологические науки, 2, 73, 1959.
12. Орбелл Л. А., Фурсиков Д. С., Изв. научн. инст. им. Лесгафта, 8, 1924.
13. Проппер Н. И., Физиол. ж. СССР, 21, 5, 702, 1936.
14. Лапицкий Д. А., Наумова О. А., Бюлл. экспер. биол. и мед. 9, 6, 1940.



15. Лапицкий Д. А., Механизмы патологических реакций, Л., 9, 165, 1947.
16. Малкиман И. И., Бюлл. эксп. биол. и мед., 38, 7, 27, 1954.
17. Давиденков С. Н., Руководство по неврологии, Л., 6, 257, 1960.
18. Лобова Л. П., Архив биол. наук, 49, 3, 106, 1938.
19. Серейский М. Я., Новые пути диагностики и лечения эпилепсии, М., 1945.
20. Зурабашвили А. Д., Ж. невропат. и психиатр., 14, 3, 26, 1945.
21. Рохлин Л. Л., Пробл. соврем. психиатр., М., 179, 1948.
22. Портнов А. А., Федотов Д. Д., В кн.: Проблема эпилепсии, М., 5, 1959.
23. Penfield W., Jasper H., Epilepsy and the functionale anatomy of the human brain, Boston, 1954.
24. Виноградов Н. В., Бюлл. ВИЭМ, 3, 1936.
25. Середина М. И., Канд. дисс., 1946.
26. Середина М. И., Журнал высшей нерв. деят., 2, 5, 653, 1952.
27. Марков Д. А., Гельман Т. М., Эпилепсии и их лечение. Минск, 1954.
28. Аптер И. М., Ж. нерв. и психиатр., 55, 5, 321, 1955.
29. Меграбян А. А., Арутюнян Р. К., Авакян С. Л., Ж. эксперимент. и клин. медицины, 1, 2, 47, 1964.
30. Семенов С. Ф., Сб.: Эпилепсия, М., 1, 308, 1964.
31. Марков Д. А., Сб.: Эпилепсия, 1, 37, 1964.
32. Голубков О. З., Материалы Всероссийской конференции по пробл. эпилепсии, М., 95, 1964.
33. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, Киев, 46, 1965.
34. Крейнндлер А., Эпилепсия, М., 247, 1960.
35. Погодаев К. И., Биохимия эпилептического приступа, М., 1964.
36. Хамитов Х. С., Сб.: О физиологической роли медиаторов, Казань, VII, 88, 1959.
37. Правдич-Неминская Т. В., ДАН СССР, 63, 3, 405, 1949.
38. Dalglish C. E., Toh C. C., Work T. S., J. Physiol., Lond., 120, 289, 1959.
39. Лебединский А. В., Пробл. физиол. оптики, 6, 7, 1948.
40. Уфлянд Ю. М., Физиология двигат. аппарата человека, Медицина, 26, 1965.
41. Шапиро К. М., Электрофизиологические исслед. двигательного аппарата, Л., 281, 1961.
42. Шевелев И. Н., Цветная хронаксия, Харьков, 1952.
43. Фейгенберг И. М., Пробл. физиол. оптики, 7, 17, 1949.
44. Langemann H., Helvet. Physiol. et Pharmacol. Acta, 12, 28, 1954.
45. Himwich H. E., Rinaldi F., Brain mechanisms and drug action, Springfield, 1957.
46. Ильюченко Р. Ю., Нейро-гуморальные механизмы ретикулярной формации ствола мозга, М., 1965.
47. Альперн Д. С., Холинэргические процессы в патологии, М., 1963.

# ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

---

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ ОРГАНИЗМА В ПЕРИОД ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА

Е. Н. Хватова, Г. Я. Городисская, Н. Швец

Горьковский медицинский институт, Центральная научно-исследовательская лаборатория, Горький

Охлаждение теплокровного организма и особенно процесс последующего восстановления исходной температуры тела предъявляют всему организму в целом особые требования, определяя участие и заинтересованность в первую очередь энергетических систем.

Работами С. Е. Северина, В. П. Скулачева, В. Г. Сивковой, С. П. Маслова (1), В. П. Скулачева (2), С. А. Нейфаха, Е. П. Здоровской (3, 4), R. E. Smith, A. S. Fairhurst (5), R. E. Smith (6), J. P. Hannon (7) и др. показана роль окислительных процессов в общей терморегуляторной реакции организма. Установлены значение теплообразовательной функции свободного окисления и роль процесса разобщения между окислением и фосфорилированием при включении химической терморегуляции (С. Е. Северин, В. П. Скулачев и др., 8; В. П. Скулачев, С. П. Маслов, В. Г. Сивкова и др., 9; S. L. Panagos, R. E. Beyer, 10 и др.).

В продолжение наших предшествующих работ (11—13) настоящее исследование посвящено изучению состояния окислительных систем митохондрий мозга, выделенных на глубине охлаждения при полном и частичном выключении механизмов терморегуляции, на разных этапах самостоятельного согревания животных и при согревании их с помощью дополнительного обогрева. Изучались окислительная и фосфорилирующая активность, коэффициент фосфорилирования и активность сукцинат:цитохром С-оксидоредуктазы митохондрий мозга.

Охлаждение кроликов-самцов проводилось под эфирным наркозом различной глубины. Минимальная ректальная температура в разных опытах достигала 19°—20° С и 24°—25° С. Выделение

митохондриальной фракции из мозга проводилось методом последовательного дифференциального центрифугирования (А. Фо-пуо, J. Samogui, 14), окисление измеряли по поглощению кислорода манометрически методом Варбурга, фосфорилирование — по убыли неорганического фосфата в процессе инкубации митохондрий. Определение неорганического фосфата проводили по методу Самнера, белок митохондрий — по методу Лоури. Расчет проводили в мкг · ат кислорода и фосфора на 1 мг белка митохондрий. Инкубационная смесь готовилась по прописи D. Dahl, J. Samson (15), температура инкубации — 26°С. Сукцинат: цитохром С-оксидоредуктазную активность митохондрий определяли спектрофотометрически по методу S. J. Cooperstein, A. Lazarow, I. Kurfess (16), оптическую плотность митохондрий — по методу K. Cleland (17).

### Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты измерения окисления и фосфорилирования, а также коэффициент Р/О в митохондриях мозга интактных животных, у животных в состоянии эфирного наркоза, у охлаждавшихся с полным и частичным исключением терморегуляции и при восстановлении температуры тела в разных условиях.

При охлаждении животных до ректальной температуры 20°С со стойким исключением механизмов терморегуляции дыхательная активность митохондрий снижается, а при охлаждении до той же температуры с неполным исключением механизмов термогенеза (развитие холодовой дрожи) дыхание митохондрий резко увеличивается.

В период восстановления температуры тела окислительная активность митохондрий мозга зависит от состояния термогенеза в организме. При самостоятельном согревании животных в начальном периоде активного подъема температуры тела при ректальной температуре 30°—31°С окислительная активность увеличивается и в большинстве случаев при дальнейшем повышении температуры тела продолжает нарастать.

При искусственном обогревании после охлаждения интенсивность окисления зависела от состояния животного. Если одновременно с обогреванием у животных появлялись признаки мышечной дрожи — окислительная активность была высокой, хотя и ниже, чем при самостоятельном согревании животных. В случае быстрого активного согревания, когда животные, несмотря на повышение температуры тела, были вялыми, дыхательная активность митохондрий мозга оставалась низкой.

При полном восстановлении температуры тела (36°—37°С) окислительная способность митохондрий приближается к вели-



Таблица

Окисление и фосфорилирование в митохондриях мозга в зависимости от характера охлаждения и последующего восстановления температуры тела

Состояние животного	Окисление в мкг·ат О на 1 мг бел- ка митохонд- рий	Фосфорилир. в мкг·ат Р на 1 мг бел- ка мито- хондрий	Коэффи- циент Р/О
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
1. Интактные животные	$3,54 \pm 0,08$	$7,29 \pm 0,19$	$2,02 \pm 0,08$
2. Эфирный наркоз	$4,03 \pm 0,08$	$7,64 \pm 0,14$	$1,89 \pm 0,056$
3. Охлаждение с полной блокадой терморегуляции	$3,36 \pm 0,11$	$7,04 \pm 0,27$	$2,09 \pm 0,05$
4. Охлаждение с частичной блокадой терморегуляции	$5,87 \pm 0,2$	$11,85 \pm 0,2$	$2,00 \pm 0,01$
5. Самосогревание			
до 31° С	$5,15 \pm 0,13$	$6,29 \pm 0,4$	$1,21 \pm 0,07$
до 33° С	$7,25 \pm 0,2$	$11,80 \pm 0,4$	$1,63 \pm 0,05$
до 36°—37° С	$3,79 \pm 0,12$	$6,97 \pm 0,2$	$1,84 \pm 0,06$
6. Искусственное согревание			
без дрожи до 31°—33° С	$2,71 \pm 0,13$	$6,37 \pm 0,4$	$2,35 \pm 0,09$
с развитием дрожи до 31°—33° С	$4,12 \pm 0,19$	$9,64 \pm 0,5$	$2,32 \pm 0,07$

чине, характерной для интактных животных, хотя еще несколько превосходит ее.

Фосфорилирующее окисление также имеет свои особенности в зависимости от состояния животных. На глубине охлаждения оно несколько снижалось, если же охлаждение происходило с развитием холодовой дрожи, фосфорилирование резко увеличивалось. В начале восстановительного периода при активном теплообразовании за счет самостоятельного согревания животных фосфорилирующее окисление снижалось. При продолжающемся повышении температуры тела до 33° С оно, напротив, возрастало, и в ряде опытов достигало значительных величин. При искусственном согревании в этот период фосфорилирующая активность оставалась низкой, но в случае развития дрожи она также в значительной степени возрастала.

К моменту восстановления температуры тела, близкой к ис-

ходной, фосфорилирование приближается к уровню, характерному для интактных животных.

Коэффициент фосфорилирования, отражающий соотношение окислительной и фосфорилирующей активности в дыхательной цепи, изучался в тех же условиях опыта. При гипотермии (охлаждение с исключением терморегуляции) снимается разобщающее действие эфирного наркоза и коэффициент фосфорилирования практически не отличается от нормы. Не изменяется коэффициент Р/О и в тех случаях, когда в период охлаждения возникает холодовая мышечная дрожь. Значительное снижение коэффициента фосфорилирования наступает в начальном периоде самосогревания, что свидетельствует об ослаблении сопряженности между окислением и фосфорилированием. При дальнейшем повышении температуры тела Р/О начинает увеличиваться, хотя и остается еще ниже исходной величины.

При искусственном согревании животных, независимо от развития или отсутствия в этот период дрожи, коэффициент Р/О в равной степени умеренно увеличен, свидетельствуя об усилении доли фосфорилирующего окисления в этом состоянии. При этом активность процесса фосфорилирования разная, т. к. при возникновении дрожи уровень окислительных реакций почти в два раза выше, чем при спокойном состоянии животных.

К моменту нормализации температуры тела коэффициент фосфорилирования еще не достигает исходной величины.

Учитывая, что истинное соотношение свободного и фосфорилирующего окисления в дыхательной цепи зависит не только от факторов, действующих *in vivo*, но может быть искажено за счет компонентов инкубационной смеси или за счет особых условий инкубации, активирующих преимущественно свободное или фосфорилирующее окисление, мы провели измерение Р/О в разных условиях инкубации. С этой целью реакционную смесь дополняли активаторами свободного окисления — ионами Са или активаторами фосфорилирующего окисления — сывороточным альбумином, применяли преинкубацию митохондрий на разные сроки, а также проводили определение дыхательного контроля. Величина дыхательного контроля выражалась отношением потребленного кислорода ( $\Delta O$ ) в присутствии фосфата и его акцепторов, к потреблению кислорода ( $\Delta O$ ) в безакцепторной среде, что позволяет судить о доле свободного окисления в суммарном окислении дыхательной цепи.

На рис. 1 представлены коэффициент Р/О и дыхательный контроль у животных на глубине охлаждения, охлаждавшихся с полной и частичной блокадой терморегуляции. Из приведенных результатов видно, что введение ионов  $Ca^{++}$  и добавление сывороточного альбумина не выявляет существенных различий в величине Р/О у этих двух групп животных. Более чувствительными тестами явились дыхательный контроль и преинкубация. Воз-

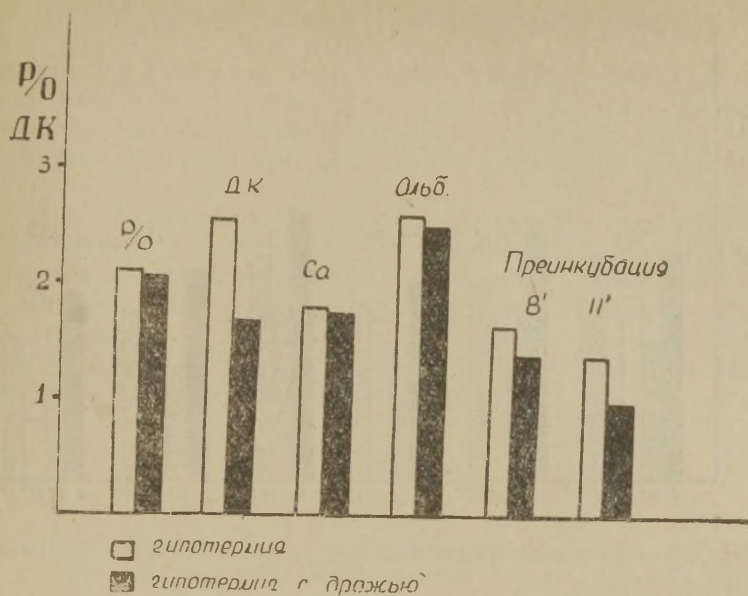


Рис. 1. Выявление изменений коэффициента Р/О и дыхательного контроля при охлаждении с полной и частичной блокадой терморегуляции.

никновение дрожи при охлаждении способствует заметной утрате дыхательного контроля, а 8-и, особенно, 11-минутная преинкубация в значительно большей степени снижают Р/О у этой группы животных.

При самосогревании животных (рис. 2) преинкубация митохондрий и введение ионов  $\text{Ca}^{++}$  в инкубационную смесь в значительной степени усиливают разобщающий эффект, особенно в начальном периоде восстановления температуры тела, и выявляют его в конце самосогревания, когда в обычном составе инкубационной смеси коэффициент Р/О практически достигает исходных величин. Введением в инкубационную смесь сывороточного альбумина удастся повысить коэффициент фосфорилирования, однако в присутствии даже такого мощного сопрягающего фактора он не достигает исходных величин.

У животных, искусственно обогревавшихся после охлаждения, не удалось установить существенной разницы в состоянии дыхательной цепи митохондрий в зависимости от возникновения или отсутствия дрожи в этот период. Из рис. 3 видно, что ни один из применяемых тестов не смог выявить достоверной разницы в величине Р/О у этих двух групп животных. Различие в состоянии дыхательной цепи митохондрий мозга животных выра-



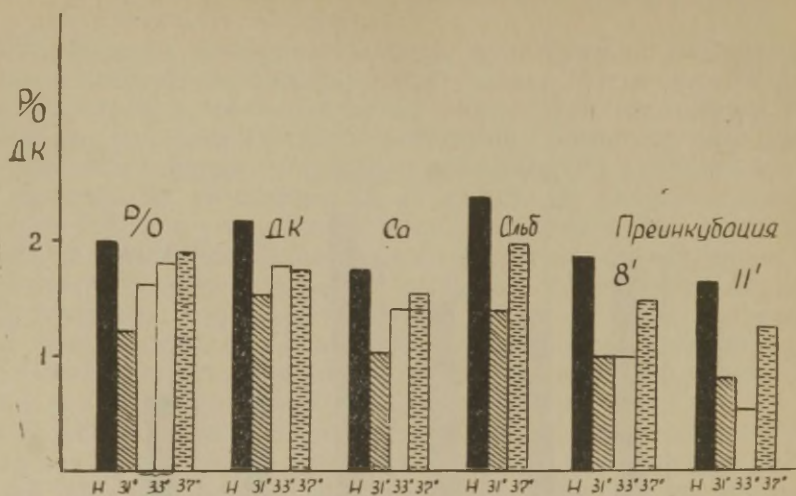


Рис. 2. Усиление эффекта разобщения при самосогревании организма после охлаждения.

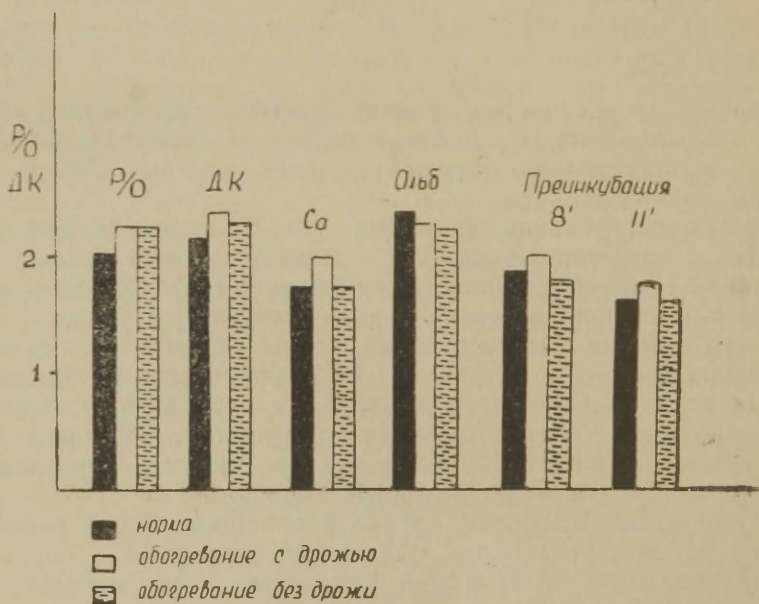


Рис. 3. Выявление изменений коэффициента P/O и дыхательного контроля при искусственном согревании организма после охлаждения.

жалось только в разной степени активации окислительных процессов.

Активность сукцинат: цитохром *c*-оксидоредуктазы митохондрий находится в соответствии со свободным окислением. Наибольшая активность фермента установлена в период подъема температуры тела при самостоятельном согревании животных.

Изучение оптической плотности митохондрий как одного из показателей их структурного состояния показало, что общее охлаждение организма способствует снижению оптической плотности митохондрий мозга, возникновение холодной мышечной дрожи приводит к дальнейшему ее уменьшению, а повышение температуры тела быстро восстанавливает оптическую плотность до величины, близкой к исходной (рис. 4).

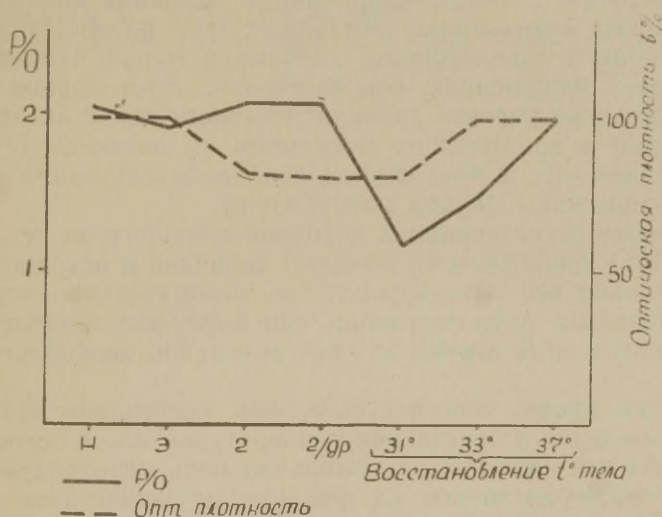


Рис. 4. Коэффициент  $P/O$  и оптическая плотность митохондрий при охлаждении и последующем самосогревании животных.

Представленный материал свидетельствует о том, что энергетика мозга прямо связана с общей энергетической реакцией организма. Охлаждение организма с выключением механизмов терморегуляции способствует усилению сопряженности между фосфорилированием и окислением в мозгу. Возникновение холодной дрожи в период охлаждения в значительной степени стимулирует в мозгу окисление при полном сохранении сопряженности его с процессом фосфорилирования. Это, возможно, обес-

печивает повышенный синтез высокоэнергетических фосфатов, накопление которых в мозгу установлено в исследованиях Я. И. Векслера и З. С. Гершеневича (18) и др. В то же время применение тестов, рассчитанных на избирательную стимуляцию одного из путей окисления, показало, что возникновение дрожи в период охлаждения оказывает истощающее действие на ферментные системы дыхательной цепи митохондрий. Это проявляется в значительной утрате величины дыхательного контроля, а также в заметном снижении коэффициента фосфорилирования после преинкубации. При самосогревании организма после охлаждения заинтересованность энергетических систем мозга в общей реакции организма выражена в еще большей степени. В период наиболее интенсивной теплопродукции в организме, т. е. в начале процесса самосогревания, в мозгу заметно активизируется свободное окисление при значительном уменьшении сопряженности окисления с фосфорилированием. Добавка ионов  $\text{Ca}^{++}$  и преинкубация митохондрий усиливают этот разобщающий эффект, а добавка сывороточного альбумина только частично восстанавливает нарушенную сопряженность. Этот период характеризуется также высокой сукцинатдегидрогеназной активностью митохондрий и наибольшим снижением их оптической плотности. По-видимому, в этот период свободное окисление охватывает большую часть тельца митохондрий.

К моменту восстановления исходной температуры тела коэффициент Р/О приближается по своей величине к исходному значению. Однако все остальные тесты, избирательно направленные на отдельные пути окисления, еще выявляют ослабление сопряженности в этот период за счет активации свободного окисления.

В то же время, при искусственном согревании организма после охлаждения и повышении температуры тела в основном за счет экзогенных факторов, дыхательная цепь митохондрий переключена преимущественно на фосфорилирующий путь окисления. Коэффициент фосфорилирования смещен в сторону его увеличения, и дополнительные тесты выявляют устойчивость дыхательной цепи с преимущественной активацией фосфорилирующего окисления.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что направленность энергетических процессов в ЦНС находится в тесной и прямой связи с энергетическими затратами организма в целом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Северин С. Е., Скулачев В. П., Сивкова В. Г., Маслов С. П., ДАН СССР, 147, 1489, 1962.
2. Скулачев В. П., Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, 1962.



3. Нейфах С. А., IX Всесоюзный съезд общества физиологов, биохимиков, фармакологов, т. 3, 153, 1959.
4. Нейфах С. А., Здродовская Е. П., Биохимия, **26**, 6, 1961.
5. Smith R. E., Fairhurst A. S., Proc. Nat. Acad. Sci., **44**, 705, 1958.
6. Smith R. E., Federat. Proc., **19**, Suppl. 5, 146, 1960.
7. Hannon J. P., Federat. Proc., **19**, Suppl. 5, 139, 1960.
8. Северин С. Е., Скулачев В. П., Маслов С. П., Бенедиктов И. И., Шестаков В. Г., ДАН СССР, **131**, 1447, 1960.
9. Скулачев В. П., Маслов С. П., Сивкова В. Г., Калинин-ченко Л. П., Маслова Г. М., Биохимия, **28**, 70, 1963.
10. Papagos S. L., Beyer R. E., Am. J. Physiol., **199**, 836, 1960.
11. Хватова Е., Швец Н., Вопросы медицинской химии, **9**, 5, 1965.
12. Городисская Г., Хватова Е., Швец Н., Укр. биохим. ж., **5**, 1965.
13. Хватова Е., Швец Н., В кн.: Митохондрии, структура и фракции, М., 85, 1966.
14. Fonyo A., Samogyi J., Acta Physiol. Acad. Sci. hung., **18**, 191, 1960.
15. Dahl D. R., Samson T. E., Am. J. Physiol., **196**, 470, 1959.
16. Cooperstein S. J., Lazarowa A., Kurfess G., J. Biol. Chem., **186**, 1, 1950.
17. Cleland K. W., Nature, **170**, 497, 1952.
18. Векслер Я. И., Гершеневич З. Г., Биохимия, **30**, 3, 1965.

## ВЛИЯНИЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ШОКА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

О. Н. Бармина, Н. П. Андреева, О. А. Смирнова, П. П. Загоскин,  
С. Н. Корытникова, Е. В. Чебыкина

Кафедра биохимии Горьковского медицинского института  
им. С. М. Кирова, Горький

Проблема травматического шока отнюдь не является новой, однако, до сих пор она не потеряла своей актуальности. Так, если изменения некоторых видов рефлекторной деятельности организма при шоковом состоянии изучены сравнительно хорошо, то обменные процессы на различных этапах шока исследованы недостаточно (И. П. Петров, 12).

Внимание советских исследователей все более привлекают нарушения окислительных процессов в различные периоды шока как в организме в целом, так и в ЦНС в частности (Г. В. Дервиз, 6; В. Г. Борисов, 3; И. М. Бондарев, 1; И. Д. Кудрин, 8 и др.). С развитием концепции об окислительном фосфорилировании (В. А. Энгельгардт; В. А. Белицер и Е. Т. Цыбакова, 2) этот процесс стал широко изучаться при различных функциональных и патологических состояниях ЦНС. Однако при травматическом шоке окислительное фосфорилирование в нервной ткани стало изучаться только в последнее время (А. А. Покровский и Л. Ф. Панченко, 13; Л. Ф. Панченко и Н. Н. Боголепов, 14). Мало имеется также работ, в которых делаются попытки сопоставления биохимических изменений, наблюдаемых в целостном организме и в условиях *in vitro*. Поэтому одним из направлений нашей работы было проследить изменения напряжения кислорода в коре головного мозга в динамике шока и сопоставить эти данные с данными, полученными *in vitro* при изучении окислительного фосфорилирования в мозговой ткани.

Кроме окислительных процессов нами исследовались некоторые стороны белкового обмена (изучение процессов амидирования и дезамидирования белков, исследование активности аминофераз, определение содержания сульфгидрильных групп в головном мозгу животных, находящихся в шоковом состоянии).

Значительный интерес представляет выяснение роли электролитов (калия и натрия) в механизмах развития шока, однако обмен их в мозгу изучен недостаточно. Поэтому нами было исследовано содержание калия и натрия в коре головного мозга животных при экспериментальном травматическом шоке.

### Методика

Опыты проводились на белых крысах, кроликах и щенках. Шок вызывался либо путем механического травмирования задних конечностей животных, либо путем лапаротомии с последующей эвентрацией кишечника и потягиванием за брыжейку, либо при помощи раздражения электрическим током. Для характеристики стадии и степени шокового состояния использовались следующие критерии: поведение животного (крик, судороги или, напротив, адинамия, общее угнетение), исследование артериального кровяного давления и ректальной температуры. Давление измерялось кровавым способом в бедренной или сонной артерии и записывалось кимографически. Ректальная температура регистрировалась термисторным датчиком.

Напряжение кислорода в коре головного мозга кроликов измерялось полярографически с помощью платинового электрода, покрытого полиэтиленовой пленкой при разности потенциалов 0,6 в. В качестве регистрирующего прибора использовался полярограф-самописец ПА-3.

Окислительное фосфорилирование изучали в митохондриях и гомогенатах мозговой ткани. Митохондрии выделялись общепринятым методом в 0,25 М растворе сахарозы (Д. Хогебум и В. Шнейдер, 15). Исходным материалом для выделения митохондрий служил 10% гомогенат, приготовленный на 0,25 М растворе сахарозы с 0,001 М ЭДТА. Инкубационная смесь содержала фосфатный буфер рН 7,4, хлористый калий, хлористый магний, АТФ, фторид натрия.

Акцептирующей системой для улавливания макроэргического фосфата служила смесь глюкозы и гексокиназы. Опыты были поставлены с использованием четырех субстратов окисления: сукцината,  $\alpha$ -кетоглутарата, цитрата и малата. Инкубация в аппарате Варбурга — 40 минут при температуре 33°С.

Аденозинтрифосфатазная активность гомогенатов коры головного мозга определялась по приросту неорганического фосфата в среде, содержащей АТФ, хлористый натрий, сульфат магния и боратный буфер за 15 минут инкубации (М. И. Кужман, 9).

Содержание амидных групп в ткани мозга определялось по количеству аммиака, образующегося при десятиминутном и двухчасовом гидролизе белков головного мозга с использованием изотермической перегонки по Конвею в модификации С. Ф. Эпштейн (16). Активность глутамикоаспарагиновой и глутамикоаланиновой аминофераз определялась по прописи Г. С. Пасхиной, основанной на принципе метода В. В. Умбрейта.

Сульфгидрильные группировки определялись методом амперометрического титрования с вращающимся электродом. Количественное определение ионов  $K^+$  и  $Na^+$  производилось пламенно-фотометрическим методом.

### Результаты

Как показали опыты *in vivo*, напряжение кислорода в коре мозга интактных кроликов оказалось весьма стабильным показателем и полярограмма у здоровых животных представляла собой прямую или близкую к прямой линию. При нанесении



травмы в коре головного мозга кроликов наблюдаются выраженные изменения напряжения кислорода. Как правило, после начала травмирования уровень кривой диффузионного тока, отражающий динамику напряжения кислорода в тканях, начинает снижаться, достигая максимума (38,2% по отношению к исходному уровню) к моменту развития шокового синдрома (рис. 1).

Лишь в нескольких случаях нам удалось зарегистрировать повышение уровня напряжения кислорода после начала травми-

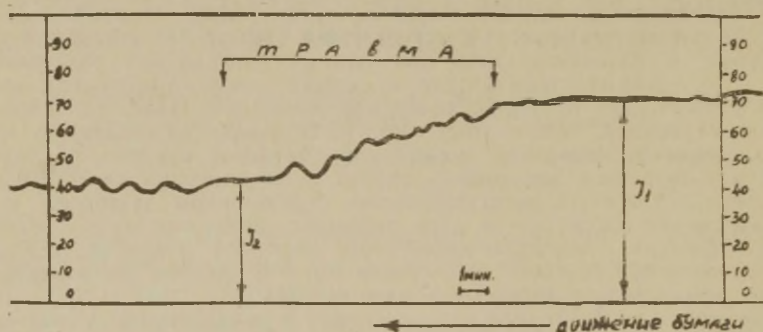
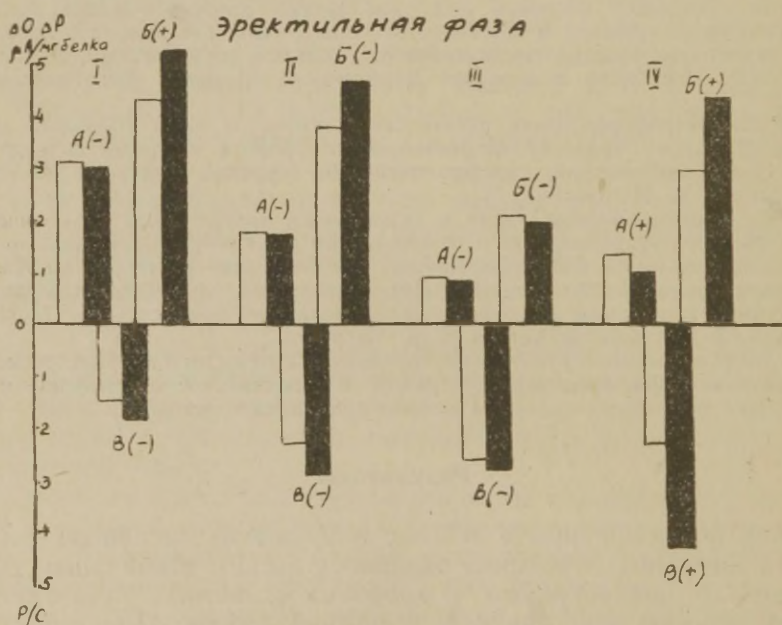


Рис. 1.  $I_1$  — исходный диффузионный ток;  $I_2$  — диффузионный ток в период торпидного шока. Предел чувствительности — 0,2.



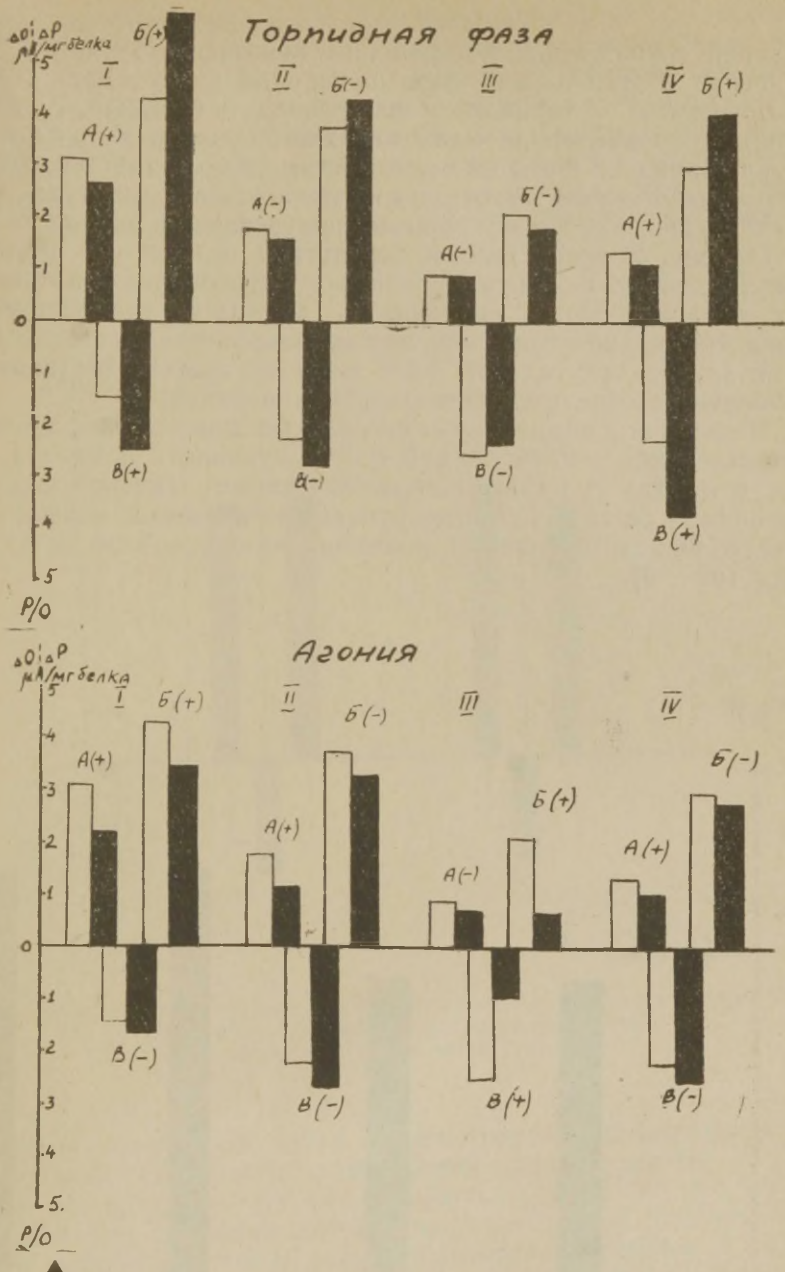


Рис. 2. Окислительное фосфорилирование в митохондриях коры головного мозга кроликов на различных этапах шока.

Обозначения: I — сукцинат, II —  $\alpha$ -кетоглутарат, III — цитрат, IV — малат. □ — контроль, ■ — шок; (+) — достоверные изменения, (—) — недостоверные изменения. Потребление кислорода и связывание фосфора выражены в микрограмм-атомах на миллиграмм белка митохондрий.

рования, совпадающее по времени с повышением артериального давления в эректильной фазе шока. Однако и в этих случаях при переходе в торпидную фазу шока наблюдалось падение напряжения кислорода ниже исходного уровня. В период развития торпидной фазы на полярограмме в большинстве экспериментов отмечалось значительное увеличение амплитуды флуктуаций (рис. 1). Таковы данные, полученные в опытах *in vivo*.

На рис. 2 представлены результаты опытов по изучению окислительного фосфорилирования в митохондриях и гомогенатах головного мозга кроликов в динамике травматического шока. Как видно из рисунка, при использовании  $\alpha$ -кетоглутарата и цитрата в эректильной фазе шока не выявляется заметных изменений в окислительном фосфорилировании.

Некоторое повышение связывания фосфора наблюдается при использовании в качестве субстратов сукцината и малата, причем в опытах с малатом выявлено также заметное снижение дыхания, в связи с чем значительно увеличивается коэффициент Р/О. АТФазная активность мозговой ткани при этом не изменялась (рис. 3).

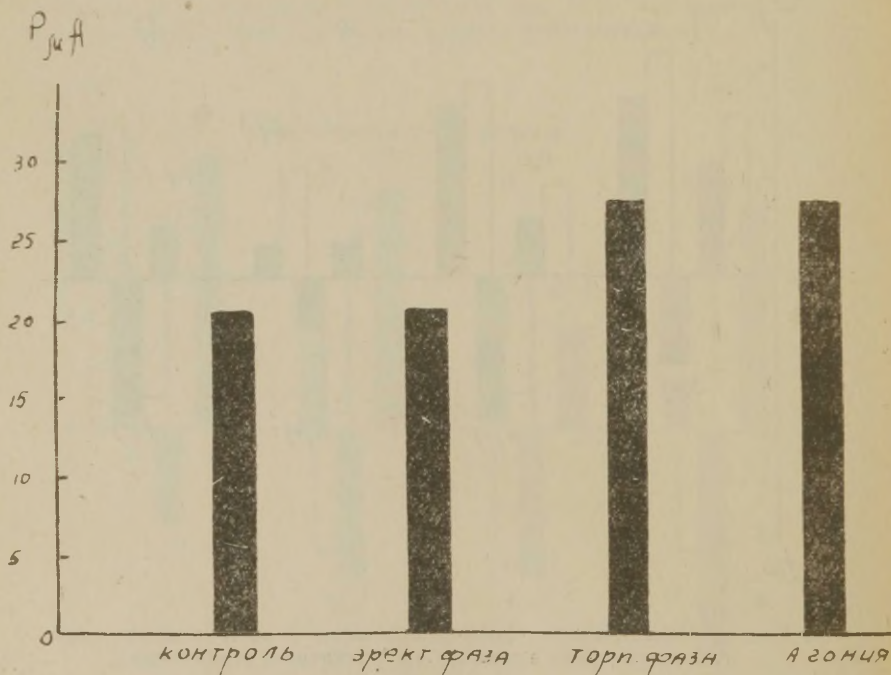


Рис. 3. Аденозинтрифосфатазная активность (в мкг Р<sub>неорг</sub>/100 мг ткани/час) гомогенатов коры головного мозга кроликов при шоке.



При изучении окислительного фосфорилирования в торпидной фазе шока наиболее яркие изменения были выявлены в опытах с сукцинатом и малатом. Коэффициент фосфорилирования при использовании этих субстратов значительно повышается за счет уменьшения потребления кислорода митохондриями мозга и усиления утилизации неорганического фосфата. Аналогичные результаты получены в опытах с гомогенатами коры головного мозга при добавлении сукцината в качестве субстрата окисления (рис. 4).

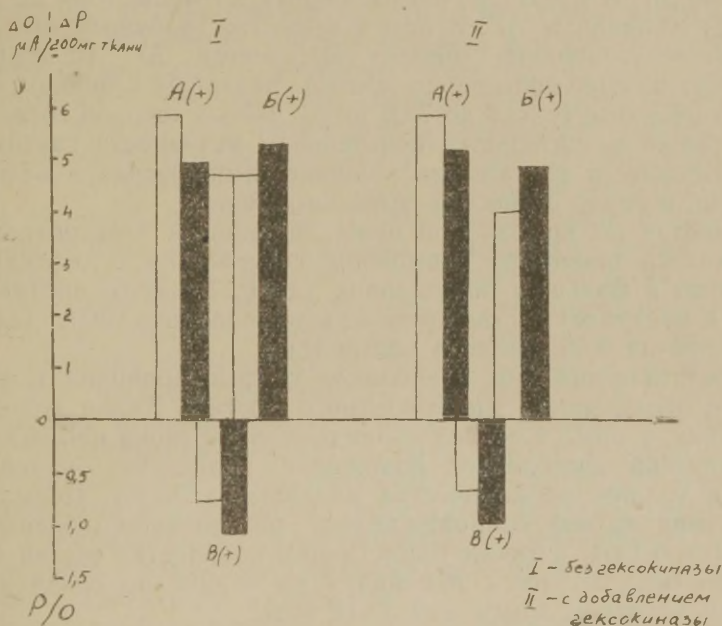


Рис. 4. Окислительное фосфорилирование в гомогенатах коры мозга кроликов при шоке (торпидная фаза).  
Обозначения те же, что и к рис. 2.

В торпидной фазе шока, кроме того, отмечалось увеличение АТФазной активности гомогенатов коры головного мозга (рис. 3). В агональном периоде шока (рис. 2 В) наблюдается дальнейшее снижение потребления кислорода митохондриями коры головного мозга, сопровождающееся, однако, в отличие от торпидной фазы, снижением связывания минерального фосфата. Эти изменения наиболее выражены при добавлении сукцината и цитрата. Коэффициент Р/О значительно снижается по сравнению с торпидной фазой, но лишь в опытах с цитратом

выявлено статистически достоверное снижение Р/О по сравнению с контролем.

АТФазная активность ткани коры мозга в данный период оставалась повышенной по сравнению с активностью фермента в норме, но не изменялась по сравнению с торпидной фазой (рис. 3).

Экспериментальный травматический шок сопровождался, кроме того, выраженными изменениями белкового обмена. Так, в опытах на щенках было показано, что в сером веществе головного мозга наблюдается изменение между лабильными и прочно связанными амидными группировками (АГ) за счет увеличения (с 69 до 78 мг%) прочно связанных и уменьшения (с 29 до 25 мг%) лабильных АГ. В белом веществе головного мозга наблюдается увеличение общего количества АГ (с 89,6 до 99,7 мг%) за счет повышения прочно связанных с белком амидных группировок (с 63,4 до 73,9 мг%). Шок у щенков сопровождался также значительным повышением активности глутамико-аспарагиновой и глутамикоаланиновой аминотерминаз в белом и, особенно, в сером веществе головного мозга.

В опытах на крысах при шоке, вызванном электротравмой, наблюдалось некоторое повышение содержания сульфгидрильных групп в больших полушариях (до 0,71 ммоль против 0,64 ммоль в контроле) и стволовом отделе головного мозга (до 0,62 ммоль против 0,56 ммоль в контроле).

Травматический шок у кроликов и крыс приводил к значительным изменениям электролитного состава ткани головного мозга. Так, у крыс в период торпидной фазы шока наблюдалось статистически достоверное понижение количества калия (на 3,5%) и увеличение количества натрия (на 5,2%). Повышение содержания натрия сопровождалось повышением содержания хлора (на 6,1%), а также нарастанием количества общей воды. Плотный остаток мозга изменялся на 8—9% по сравнению с плотным остатком мозга здоровых крыс.

## Обсуждение

Выявленное снижение напряжения кислорода подтверждает мнение о наличии глубокого гипоксического состояния ткани головного мозга при травматическом шоке. Это снижение напряжения кислорода обусловлено, по-видимому, в основном резким нарушением мозгового кровообращения. Этот вывод подтверждается данным Я. Лихтенберга, который показал, что мозговое кровообращение, определяемое методом реоплетизмографии, снижается при шоке приблизительно в 2 раза (Я. Лихтенберг, 10).

Снижение напряжения кислорода может также обуслови-

ваться метаболическими причинами (усиление окислительных процессов), однако, это предположение нельзя считать вероятным, учитывая наши данные и данные других авторов (Н. М. Бондарев, 1) о снижении потребления кислорода мозговой тканью *in vitro*.

Работами школы проф. И. Р. Петрова было показано, что в торпидной фазе травматического шока наблюдается значительное уменьшение запасов АТФ и фосфокреатина в мозгу (И. Р. Петров, 12). Это может быть обусловлено, во-первых, общим угнетением окислительных процессов под влиянием циркуляторной гипоксии, во-вторых, разобщением процесса окислительного фосфорилирования, то есть уменьшением эффективности работы механизма синтеза энергии, и в-третьих, усилением активности аденозинтрифосфатаз мозговой ткани.

Согласно полученным нами данным, в опытах *in vivo* травматический шок не сопровождается уменьшением эффективности окислительного фосфорилирования вплоть до агонального периода. Этот факт говорит о том, что *потенциальные* возможности мозговой ткани для осуществления сопряженного фосфорилирования остаются весьма длительное время ненарушенными. Однако в целостном организме шок может привести к уменьшению суммарного количества макроэргических соединений в коре головного мозга, по всей вероятности, за счет общего снижения потребления кислорода мозгом, а также за счет активации аденозинтрифосфатаз мозговой ткани, что и было установлено в наших опытах. Изменения белкового обмена при шоке, найденные нами, связаны, по-видимому, с одной стороны, с изменением в структуре белковых молекул (увеличение прочно связанных и уменьшение лабильных амидных группировок, увеличение количества сульфгидрильных группировок), а с другой стороны, с изменением белково-синтезирующей функции клеток мозга (активация аминотрансфераз).

Количественные изменения электролитов и воды в головном мозгу животных при травматическом шоке можно объяснить поступлением их из кровяного русла.

### Заключение

При экспериментальном травматическом шоке наблюдаются значительные изменения в обмене веществ головного мозга. Особенно обращает на себя внимание резкое снижение напряжения кислорода в коре головного мозга, установленное *in vivo* при помощи вживленных платиновых электродов.

Снижение напряжения кислорода, по-видимому, обусловлено гемодинамическими факторами. Тот факт, что столь жизненно важный процесс, как окислительное фосфорилирование, не



уменьшает степени сопряженности даже при тяжелом торпидном шоке, указывает на большие потенциальные возможности тканей мозга.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарев И. М., Автореферат канд. дисс., Ростов-н/Д, 1956.
2. Белицер В. А., Цыбакова Е. Т., Биохимия, 4, 516, 1939.
3. Борисов В. Г., Автореферат канд. дисс., Л., 1953.
4. Врба Р., Успехи современной биологии, 41, 331, 1956.
5. Гершеневич З. С., Кричевская А. А., Лукаш А. И., Ходыкина Н. А., Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, 92, 1963.
6. Дervиз Г. В., Автореферат докт. дисс., М., 1950.
7. Дерябина Т. И., Карлик Л. Д., Материалы к III Поволжской конференции физиологов, биохимиков, фармакологов, 195, 1963.
8. Кудрин И. Д., Бюлл. exper. биол. и мед., 3, 29, 1963.
9. Кужман М. И., Докт. дисс., Куйбышев, 1965.
10. Лихтенберг Я., Хирургия, 1, 1957.
11. Мартинсон Э. Э., Тяхепылд Л. Я., Биохимия, 26, 984, 1961.
12. Петров И. П., Патол. физиология и exper. терапия, 5, 6, 1962.
13. Покровский А. А., Панченко Л. Ф., ДАН СССР, 4, 158, 984, 1964.
14. Панченко Л. Ф., Боголепов Н. Н., ДАН СССР, 6, 160, 1401, 1965.
15. Хогбум Д., Шнейдер В., В сб.: Нуклеиновые кислоты, М., ИЛ, 102, 1957.
16. Эпштейн С. Ф., В кн.: Вопросы биохимии мышц. Изд-во АН Укр. ССР, Киев, 212, 1954.

## НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ЧЕРТЫ И ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ВРЕДНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СРЕДЫ

М. В. Гунько, Л. И. Мищенко, С. Р. Френкель

Биохимическая лаборатория Института гигиены труда и профзаболеваний,  
Харьков

На предыдущей конференции нами были представлены данные (1) об однотипном изменении компонентов системы превращения аммиака при девяти различных интоксикациях и при гипоксии. Эти данные наряду с рядом других работ, выявивших подобные изменения при иных воздействиях, позволили говорить об однотипности изменений компонентов системы превращений аммиака в мозгу при самых разнообразных воздействиях на нервную систему.

На основании изучения некоторых механизмов возникновения этих сдвигов нами была предложена схема (1, 2), согласно которой в основе наблюдающихся изменений обмена аммиака лежит преимущественное торможение анаболических, синтетических реакций азотистого обмена при сохранении резервов макроэргов. Однако дальнейшее изучение взаимосвязи наблюдающихся изменений, выяснение конкретных механизмов их развития является совершенно необходимым.

В частности, нам представлялось целесообразным сопоставление сдвигов системы превращений аммиака со сдвигами других азотистых метаболитов, а также углеводного и других сторон обмена мозга, которое, очевидно, могло бы содействовать выяснению взаимоотношений между ними, нахождению первично или последовательно страдающих участков обмена. Это в свою очередь давало бы возможность изыскания путей направленного вмешательства в эти процессы, что является конечной целью наших исследований.

В настоящем сообщении мы приводим данные о сдвигах, наступающих при воздействии на нервную систему в основном физических факторов: интенсивного звука (звонок, 105 дБ), электромагнитных полей ультравысокой частоты (УВЧ). Эти

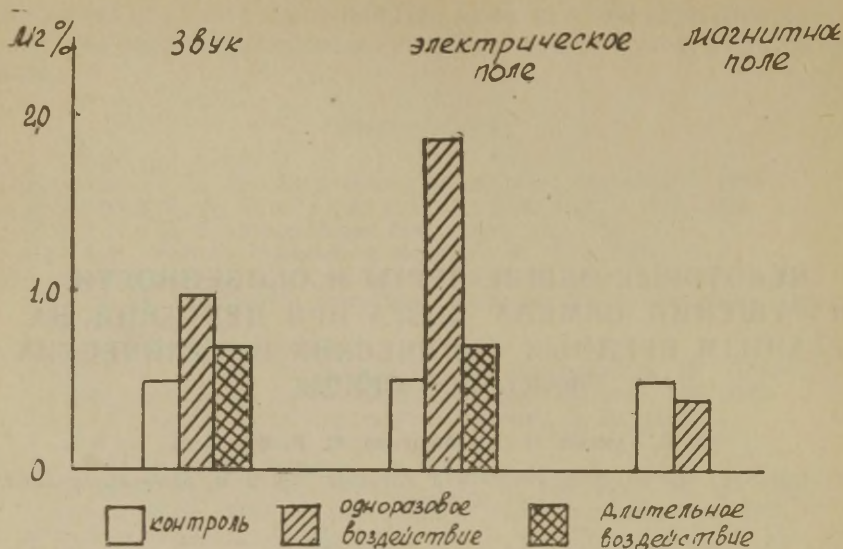


Рис. 1. Содержание аммиака в ткани мозга крыс в норме, при действии интенсивного шума и полей УВЧ.

воздействия в значительно меньшей степени нарушают общее состояние животных. Так, животные, длительное время подвергавшиеся воздействию интенсивного звука, по поведению не отличаются от контрольных. В то же время содержание аммиака у них в мозгу, как это видно из рис. 1, значительно увеличено. На этом же рисунке представлено содержание аммиака при воздействии электрического поля УВЧ, которое так же, как и при воздействии шума статистически достоверно увеличено. Таким образом, эти данные прежде всего подтверждают представление об общем, почти универсальном характере накопления аммиака в мозгу при различных воздействиях на нервную систему, нарушающих ее функцию.

Вместе с тем при изучении физических факторов, как ранее при воздействии химических, мы столкнулись, как видно из того же рис. 1, с особенностью воздействия преимущественно магнитной составляющей электромагнитного поля УВЧ, которое в отличие от электрической вызывало не увеличение количества аммиака в мозгу, а даже некоторую тенденцию к снижению его. Среди химических веществ такая особенность была нами ранее выявлена у производных ртути — двуххлористой ртути, т. е. сулемы, которая в дозах, вызывающих резкие нарушения функций организма, приводила к некоторому снижению аммиака мозга и крови.



Выявление и изучение таких «исключений из правила», как нам кажется, представляет большой интерес с различных точек зрения, в том числе возможного профилактического или терапевтического применения воздействий, снижающих аммиак мозга и крови в тех случаях, когда его количество при тех или иных воздействиях увеличено. Однако основного внимания заслуживает, очевидно, дальнейшее изучение механизмов нарушений азотистого обмена, наблюдающихся при большинстве воздействий и проявляющихся наряду с другими изменениями в значительном накоплении аммиака в мозгу.

Прежде всего представляло интерес получить данные об изменениях в содержании свободных аминокислот мозга, тесно связанных с превращениями аммиака: глутаминовой кислоты, ГАМК, аспарагиновой кислоты, аланина.

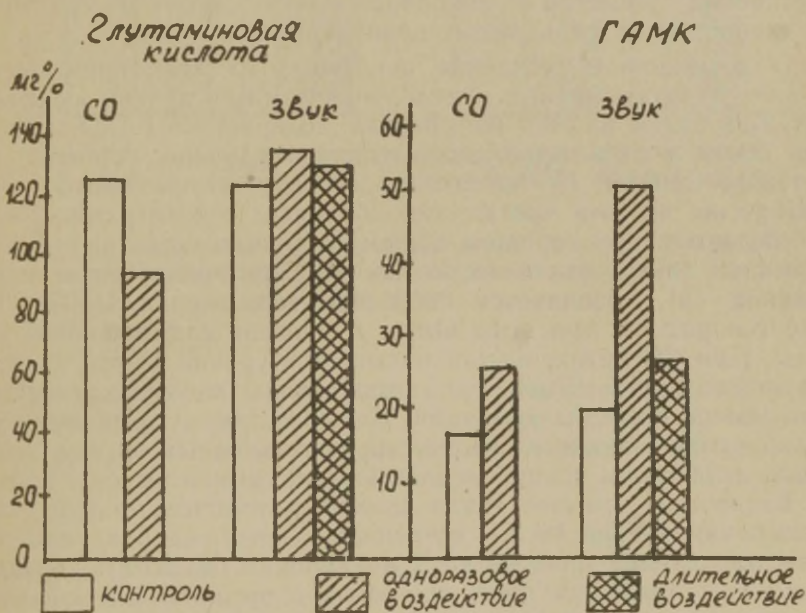


Рис. 2. Содержание глутаминовой кислоты и ГАМК в ткани мозга крыс в норме, при отравлении окисью углерода и действии интенсивного звука.

Аминокислоты определялись хроматографически. На рис. 2 представлены изменения содержания глутаминовой кислоты и ГАМК при одной из интоксикаций — окисью углерода и при действии интенсивного звука. Из рисунка видно, что и в том и в другом случае наблюдаются значительные (статистически достоверные) сдвиги в содержании как глутаминовой кислоты, так и ГАМК. Однако несмотря на то, что при действии

обоих факторов имеется однотипная реакция повышения содержания аммиака в мозгу, изменения содержания глютаминовой кислоты разнонаправлены. При кратковременном звуковом раздражении уровень глютаминовой кислоты значительно увеличен, он также увеличен, но в меньшей степени при длительном действии шума.

Это повышение уровня глютаминовой кислоты, особенно выраженное при кратковременном воздействии шума, мы трактуем как регуляторное явление, связанное с повышенными требованиями, предъявляемыми нервной системе, однако это еще должно быть экспериментально подтверждено. При СО-интоксикации, когда общее состояние животных значительно хуже, деятельность нервной системы резко угнетена, количество глютаминовой кислоты достоверно снижено, что свидетельствует, очевидно, об отставании процессов ее новообразования в мозгу по сравнению со скоростью ее дальнейших превращений.

О возможности усиления некоторых из этих превращений свидетельствуют данные определения в мозгу других аминокислот. Как видно из того же рисунка, содержание ГАМК в мозгу при обоих воздействиях значительно увеличено, особенно при кратковременном (5 часов) воздействии\* интенсивного звука. Интересно, что эти чрезвычайно большие концентрации ГАМК наблюдаются при хорошем общем состоянии животных, но под влиянием звука, как известно из ряда физиологических исследований (3), развивается состояние торможения ЦНС. Как уже говорилось, при этом высок и уровень глютаминовой кислоты. При СО-интоксикации повышение уровня ГАМК соответствует снижению количества глютаминовой кислоты, вследствие чего можно было бы думать об усилении процесса ее декарбоксилирования, однако в специально поставленных опытах увеличения активности декарбоксилазы мы не выявили.

Вследствие этого, а также исходя из опытов по предотвращению накопления ГАМК введением  $\alpha$ -кетоглутарата или глюкозы, увеличение уровня ГАМК мы склонны объяснить торможением ее дальнейших превращений, а с физиологической точки зрения — явлениями приспособления, особенно учитывая многие свойства ГАМК, выявленные в лабораториях Г. Х. Бунятына (4), которые можно было бы обозначить как трофические ее свойства.

На следующем рисунке (рис. 3) представлены данные об изменении содержания в мозгу двух других аминокислот — аспарагиновой кислоты и аланина.

Как видно, содержание аспарагиновой кислоты увеличено при кратковременном и хроническом воздействии звука, а также при СО-интоксикации, однако, благодаря большому разбросу цифр при длительном воздействии звука увеличение статистически не достоверно.

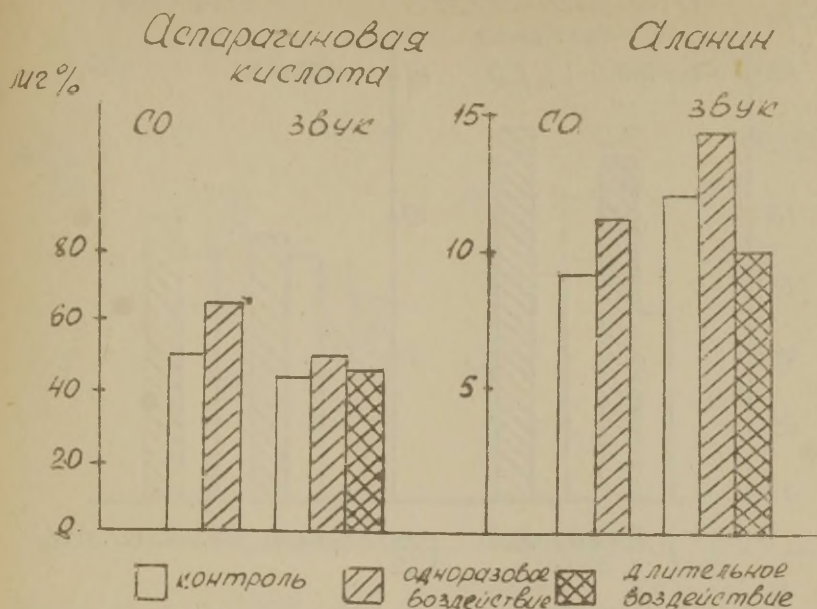


Рис. 3. Содержание аспарагиновой кислоты и аланина в ткани мозга крыс в норме, при отравлении окисью углерода и действии звука на организм.

При кратковременном воздействии интенсивного звука и при интоксикации увеличено также количество аланина в мозгу, которое при длительном действии шума сменяется его уменьшением. Увеличение содержания аспарагиновой кислоты и аланина, особенно при острых воздействиях, можно было предположительно рассматривать как результат усиления переаминирования глютаминовой кислоты на соответствующие кетокислоты, вызванного наблюдающимся во всех этих условиях накоплением в мозгу аммиака. Это было проверено нами в опытах *in vivo* путем введения избытка аммония (нагрузка аммонием) нормальным и отравленным животным. Результаты представлены на рис. 4.

Как видно из рисунка 4, после нагрузки аммонием наблюдается значительное (46,4 мг на 100 г мозга) увеличение содержания в мозгу аспарагиновой кислоты и в меньшей степени аланина, причем в равной степени у нормальных и отравленных животных. Это, очевидно, является свидетельством резервирования аммиака в виде аминокруппы аспарагиновой кислоты. Учитывая высокую активность глютамино-ЩУК-аминофазы в мозгу (Tower, 1959), механизм этого «перекачивания» аммиака



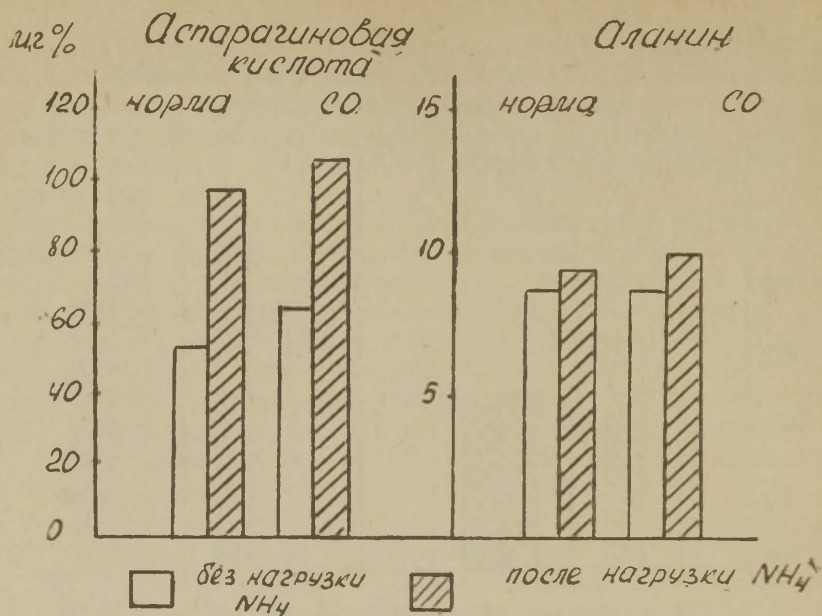


Рис. 4. Уровень аспарагиновой кислоты и аланина до и после нагрузки аммонием нормальных и отравленных животных.

в аспарагиновую кислоту скорее всего можно объяснить усилением процессов переаминирования.

Таким образом, в то время как система устранения аммиака путем синтеза глутамина и амидирования белков при интоксикациях резко заторможена, резервирование аммиака в виде аспарагиновой кислоты при той же СО-интоксикации не нарушается, являясь, возможно, важным путем устранения аммиака в условиях патологии.

Еще одним компонентом азотистого обмена, который мы исследовали при тех же воздействиях на нервную систему и вследствие этого можем сопоставить с другими изменениями, были нуклеиновые кислоты, определявшиеся спектрофотометрически по Р. Г. Цаневу и Г. Г. Маркову (5) с использованием коэффициента пересчета, предложенного Р. Т. Броун и В. В. Гончаровой (6).

На рис. 5 представлены данные о содержании РНК и ДНК при острой заправке окисью углерода и при кратковременном и длительном воздействии интенсивного звука. Как видно из рисунка, в изменениях РНК мы имеем еще один пример однотипности сдвигов, пока, правда, лишь для двух воздействий. В обоих случаях содержание РНК увеличено: при СО-интоксикации —

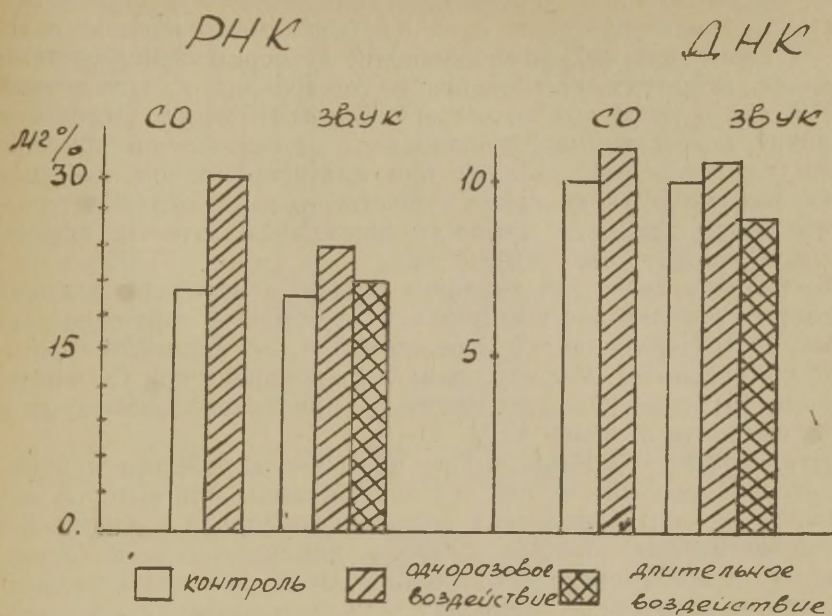


Рис. 5. Содержание нуклеиновых кислот в ткани мозга крыс в норме, при отравлении окисью углерода и действии интенсивного звука.

значительно, при остром воздействии шума — незначительно, но и в том и в другом случае статистически значимо. При длительном воздействии шума уровень РНК нормализуется. Количество ДНК при исследованных воздействиях значимо не изменено. Как трактовать увеличение содержания РНК в мозгу при нарушении его функции?

Исходя из приводившихся выше наших представлений и известных общих данных о роли нуклеиновых кислот в синтезе белка, можно думать, что оно связано с торможением синтеза белка. Увеличение количества РНК в этих условиях можно было бы объяснить снижением степени обмена, использования РНК при торможении белкового синтеза с сохранением в течение некоторого времени скорости образования самой РНК.

Некоторые работы содержат вполне определенные данные в пользу такого представления (7—9).

Таким же образом мы ранее объяснили высокие цифры содержания в мозгу макроэргов при тяжелых интоксикациях (2). Возвращение цифр содержания РНК к норме при длительном воздействии интенсивного звука может объясняться установлением равновесия на новом уровне.

Суммируя данные по изменениям азотистого обмена мозга

при воздействии ряда токсических веществ и двух физических факторов, можно отметить, что к однотипным и, очевидно, взаимосвязанным сдвигам, кроме изменений непосредственно системы аммиака, относятся еще сдвиги в содержании глутаминовой, ГАМК и аспарагиновой кислот, а также РНК мозга. Отдельные различия, как, например, увеличение, а не уменьшение концентрации глутаминовой кислоты при кратковременном действии звука, возможно, не являются существенными, а отражают различные фазы процесса, скорость протекания которых определяется интенсивностью воздействия.

Большой интерес представляет вопрос о взаимоотношениях азотистого и углеводно-энергетического обменов, нарушения которых часто наблюдаются одновременно со сдвигами азотистого обмена мозга. Мы наблюдали такие сдвиги при СО-интоксикации (6), а в последнее время — при воздействии шума и электромагнитных полей УВЧ.

Представляло особый интерес изучение механизма нарушений углеводного обмена при тех воздействиях, при которых нет непосредственного нарушения доставки кислорода к мозгу: как при интоксикациях окисью углерода, анилином и т. д. Оказалось, что и воздействие интенсивного звука, как кратковременное, так и длительное, приводит к значительному и достоверному увеличению содержания молочной и пировиноградной кислот в мозгу.

Исходя из данных М. Kato (11) о снижении содержания тиаминa в органах у крыс, подвергнутых воздействию интенсивного звука, мы предположили, что и в наших условиях может иметь место возникновение дефицита витамина В<sub>1</sub>. Многие выявленные нами нарушения обмена мозга (накопление пировиноградной, молочной кислот, нарушения синтеза глутаминa) можно поставить в связь с тиаминовой недостаточностью. Мы исследовали обеспеченность организма тиамином при воздействии звука в эксперименте и на людях, которые в производственных условиях подвергались воздействию интенсивного шума.

На рис. 6 представлены данные о содержании тиаминa в мозгу, печени и мышцах животных, подвергавшихся кратковременному (5 часов) или длительному (3 месяца) воздействию интенсивного звука. При кратковременном воздействии достоверно снижается уровень тиаминa в мозгу и печени, не изменяясь в мышцах. При длительном зашумлении уровень тиаминa в мозгу в наших условиях нормализовался, но еще больше снизился в печени и в мышцах, что, очевидно, следует рассматривать как приспособительное явление — перераспределение тиаминa в организме с поддержанием необходимого уровня его в нервной ткани. Дополнительное введение тиаминa животным, подвергавшимся действию интенсивного звука, значительно сни-



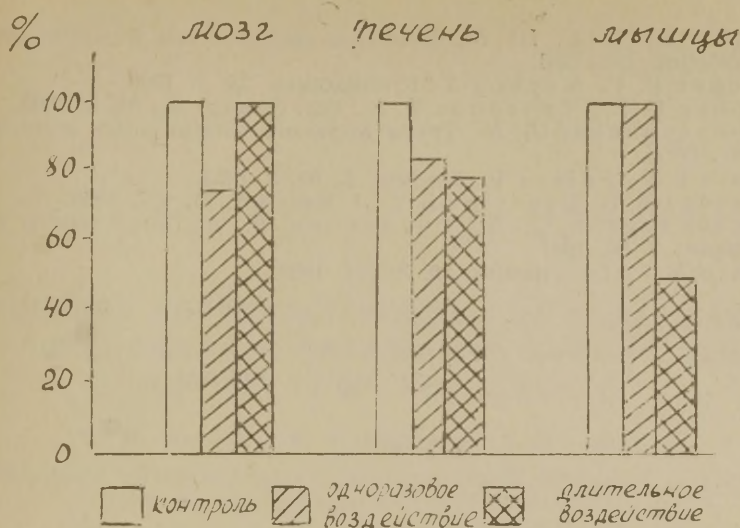


Рис. 6. Влияние интенсивного звукового воздействия на содержание витамина В<sub>1</sub> в органах крыс (в % к норме).

жало степень накопления в мозгу молочной и пировиноградной кислот.

Исследования на людях полностью подтвердили возникновение дефицита тиамина при воздействии шума на нервную систему и возможность дополнительным введением тиамина устранять этот дефицит и ряд нарушений, возникающих в организме при воздействии интенсивного шума.

Таким образом, очевидно, что в возникновении нарушений обмена мозга, появляющихся при воздействии интенсивного звука, определенную роль играет развивающаяся недостаточность тиамина. В какой степени участие этого фактора специфично для воздействия звуковых раздражителей на нервную систему, или он в той или иной степени участвует в развитии аналогичных сдвигов углеводного или азотистого обмена и при других воздействиях на нервную систему — это вопрос, который требует дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Френкель С. Р., Гордиенко Э. А., III Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, 223, 1963.
2. Френкель С. Р., Вопросы гигиены труда и профпатологии в химической и машиностроительной промышленности. Харьков, 28, 35, 1959.
3. Гаврилова Л. А., Ж. высшей нервной деятельности, 4, 5, 699, 1954.

4. Бунятян Г. Х., III Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, 133, 1963.
5. Цанев Р. Г., Марков Г. Г., Биохимия. 25, 1, 1960.
6. Броун Р. Т., Гончарова В. В., Укр. биохим. ж., 34, 5, 1962.
7. Колесниченко Л. М., Труды Киевского ветеринарного ин-та, XXIII, 97, 1957.
8. Gale E. F., Folkes P., Biochem. J., 53, 3, 1953.
9. Pardee A. B., Prestige L. S., J. Bacteriol., 71, 677, 1956.
10. Сапоцинская Е. Б., Гордиенко Э. А., Патол. физиол. и эксл. терап., 2, 53, 1961.
11. Kato Michio, Vitamins, 20, 3, 463, 1960.

## ДЕЙСТВИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ НА СОДЕРЖАНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В МОЗГУ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

М. И. Митюшов, В. Г. Шаляпина, В. В. Ракицкая

Лаборатория экспериментальной эндокринологии Института физиологии  
им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

Регулирующее влияние ЦНС на функциональную активность гипофиза и коры надпочечников при стрессе реализуется, как известно, через гипоталамус, в котором сконцентрировано большое количество биологически активных веществ. По современным представлениям проведение нервных импульсов по этой сложной системе регуляции осуществляется при участии многозвеньевой цепи нейронов, имеющих различную медиаторную природу (2). Рядом исследований установлено, что одним из пусковых факторов, участвующих в выделении АКТГ из гипофиза является норадреналин (НА, 3), содержание которого в ткани мозга снижается под влиянием ряда экстремальных воздействий (4, 8, 9). По-видимому, НА осуществляет при этом роль медиатора в передаче влияний с гипоталамуса на гипофиз (6). С другой стороны, основной гормональный компонент реакции стресс—«волна» стероидов, механизм адаптивного действия которых пока не до конца ясен, бесспорно оказывает влияние на функцию и обмен мозга. Часть из этих влияний может осуществляться за счет действия гормонов на процессы передачи импульсов путем либо потенцирования эффектов медиаторов, либо влияния на их содержание.

Следует отметить, что несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последние годы в изучении медиаторных систем мозга, многие вопросы, связанные как с реакцией биологически активных веществ при действии на организм внешних раздражителей, так и влияния компонентов реакции напряжения на нейрогормоны мозга, остаются неясными.

В данной работе изучались содержание НА и активность холинэстеразы в ткани мозга при стрессе и корреляция этих показателей с уровнем гормонов коры надпочечников в перифери-



ческой крови. Работа выполнена на крысах самцах линии Вистар, весом 180—220 г. Кортикостероиды в плазме определялись флуориметрическим методом Ван дер Виса (10), причем содержание гидрокортизона рассчитывалось арифметически путем вычета уровня кортикостерона контрольных животных. Катехоламины в ткани мозга исследовались флуориметрическим методом Эйлера и Лишайко (5) после их экстракции хлорной кислотой (1). Активность холинэстеразы определялась методом Хестрина (7).

Первая часть работы посвящена изучению вышеуказанных компонентов при кратковременном стрессе, в качестве которого использовалось действие паров эфира, продолжавшееся 2 $\frac{1}{2}$  минуты, т. е. до засыпания. Определения уровня кортикостероидов и НА проводилось через 2 $\frac{1}{2}$ , 15, 60 и 180 минут от начала применения раздражителя. Полученные данные, представленные на рис. 1, показывают, что кора надпочечников довольно быстро

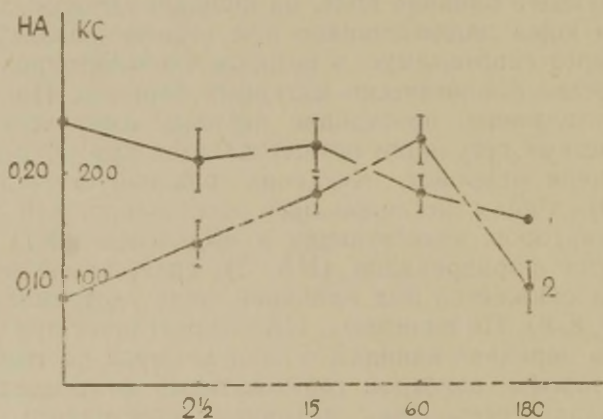


Рис. 1. Содержание норадреналина в мозгу и уровень кортикостероидов в плазме крыс при стрессе.

По оси ординат — содержание норадреналина в мкг/г (1) и уровень кортикостероидов в мкг% (2), по оси абсцисс — время в минутах.

включается в реакцию. Уже через 2 $\frac{1}{2}$  минуты имеет место нарастание содержания кортикостероидов в крови, которое достигает максимума к 60-й минуте и нормализуется к 3-у часу. Содержание НА в ткани мозга после указанного воздействия снижается. Уже через 2 $\frac{1}{2}$  минуты концентрация НА падает на 19%, через час — на 30%, а через 3 часа уровень НА составляет 62% от нормального.

Поскольку НА принадлежит определенная роль в активации адреноректорикотропной функции гипофиза, нам представлялось наиболее интересным начальное снижение содержания НА мозга в ответ на раздражитель. Нас интересовало влияние больших доз кортикостероидов на эту начальную реакцию НА, ибо известно, что стероиды, введенные извне в больших дозах, блокируют последующий выброс АКТГ на стрессорное воздействие. Кроме уровня НА, в этой серии исследований определялась активность холинэстеразы. В качестве воздействия использовалось болевое электрокожное раздражение, при котором ток напряжением 25 вольт подавался на проводочное дно клетки в течение 2 минут. Гидрокортизон-ацетат вводился внутрибрюшинно в дозе 5 мг на 100 г веса за час до раздражения. В ряде опытов гидрокортизон в той же дозе вводился на фоне длительного раздражения, при котором ток напряжением 25 вольт подавался циклами по 45 секунд, каждые 6 минут в течение суток. Введение гормона при этом производилось за 3 часа до декапитации животных. Исследованиями установлено следующее (рис. 2). Введение гидрокортизона интактным крысам в указанной дозе создает в крови высокий уровень гормона, который составляет через час после введения  $282,0 \pm 31,5$  мкг%, а через 3 часа —  $62,5 \pm 0,9$

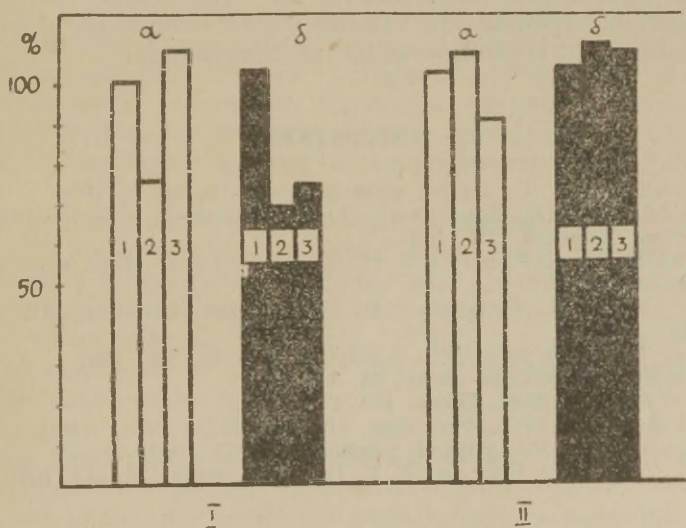


Рис. 2. Содержание норадреналина (I) и активность холинэстеразы (II), выраженные в % от нормы в раздражении. 1. Введение раствора Рингера. 2. Введение раствора Рингера + раздражение. 3. Введение гидрокортизона + раздражение. Светлые столбики — краткосрочное раздражение, темные столбики — длительное раздражение.

мкг%. Содержание НА и активность холинэстеразы при этом существенно не изменяются. Электрокожное раздражение как однократное, так и длительное приводит к выраженному снижению запасов НА в мозгу соответственно на 27,5 и 34,2% и не влияет на активность холинэстеразы. Введение гидрокортизона изменяет реакцию указанных компонентов мозга на внешнее воздействие. Гидрокортизон, введенный за час до раздражения, полностью предотвращает снижение запасов НА в мозгу и вызывает достоверное снижение активности холинэстеразы в ответ на электрокожное раздражение. Это свидетельствует о том, что большие дозы кортикостероидов изменяют реакцию как адренэргических, так и холинэргических структур мозга в ответ на раздражитель. Если гормон вводился на фоне влияния электрического тока, т. е. спустя 18 часов после его включения, он не оказывал эффекта на направленность изменений в содержании НА и активности холинэстеразы. С нашей точки зрения в данном случае гормон не оказал своего эффекта потому, что он вводился уже на фоне измененного состояния гипофизарно-адреналовой системы.

Таким образом, наши исследования показывают, что однократное введение гидрокортизона, которое в нормальном физиологическом состоянии не оказывает эффекта на содержание НА и активность холинэстеразы в мозгу крыс, существенно изменяет реакцию названных компонентов на стрессорное воздействие. С нашей точки зрения, эти данные имеют отношение к изучению адаптивной роли гормонов коры надпочечников.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шалапина В. Г., Патол. физиол. и эксп. терап., 6, 1966.
2. Шрайберг Г. Л., Дунаева Л. П., Физиология и патология эндокр. системы, Харьков, 537, 1965.
3. Эскин И. А., Щедрина Р. Н., В сб.: Гипофиз — кора надпочечников, Киев, 1964.
4. Barchas T. D., Fridman D. X., Biochem. Pharmacol., 12, 10, 1232, 1963.
5. Euler U., Lisayco, Acta physiol. scand., 51, 348, 1961.
6. Fuxe K., Acta physiol. scand., 58, 383, 1963.
7. Hestrin S., J. Biol. Chem., 180, 249, 1949.
8. Levi R., Majert E., Fed. Proc. 21, 336, 1962.
9. Strozoda L., Acta physiol. polonica, 13, 255, 1962.
10. Vies Van der, Baccar R. F. D., Acta endocr., 34, 513, 1960.



## ДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОНОВ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ЭНЕРГИЙ НА ОБМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Л. С. Черкасова, В. А. Кукушкина, Т. М. Миронова, А. Т. Пикулев,  
М. Ю. Тайц, К. В. Фомиченко, М. Ф. Кукулянская, В. Г. Фомиченко-Рембер-  
гер, С. И. Мохорева, В. Б. Сацукевич

Лаборатория биохимии Института физиологии АН Белорусской ССР,  
кафедра биохимии и биофизики Белорусского государственного университета  
им. В. И. Ленина, Минск

Дальнейшие успехи в изучении функциональной биохимии головного мозга находятся в зависимости от все более глубокого и всестороннего изучения белков и нуклеиновых кислот головного мозга. Это во многом предопределяется выявлением и расшифровкой физиологической значимости функционально активных белков ЦНС. К таковым в первую очередь относятся белки, обладающие ферментативной активностью. Однако на пути этих исследований возникает основная трудность, определяющаяся структурированием этих белков, связью их с многочисленными органеллами клетки и микроструктурами этих органелл.

В свете этих положений проводится анализ результатов исследований, посвященных изучению механизмов возникновения радиационных повреждений в ЦНС при действии относительно малых доз нейтронов промежуточных энергий.

Ранее нами (Л. С. Черкасова и др., 2, 7) было установлено возникновение и развитие значительных и длительное время продолжающихся изменений в белковом и углеводно-энергетическом обмене ЦНС при действии относительно малых доз лучей Рентгена или нейтронного облучения. И тогда же перед нами, как и перед многими радиобиологами, возник вопрос о путях опосредования действия ионизирующей радиации в животном организме, первичном и вторичном действии радиации на уровне целостного организма, его отдельных тканей, клеток, органелл и структур. Не менее важен и второй вопрос — о зависимости развивающихся радиационно-биохимических эффектов от природы ионизирующего излучения.

В последнем случае решение этой задачи экспериментально воссоздается выбором соответствующего источника облучения.

Крайне сложны и многообразны методические подходы к ответу на первый вопрос, и, очевидно, они требуют постепенного вычленения основных, наиболее важных систем связи организма с внешней средой, и систем, с участием которых происходит процесс адаптации и дальнейшего восстановления поврежденных функций животного организма. К таковым следует отнести гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему.

В этой связи, стремясь подойти к выяснению механизмов действия ионизирующей радиации на ЦНС, в зависимости от исходного функционального состояния коры надпочечников, мы провели ряд исследований на белых крысах с подавленной функцией коры надпочечников (введением в течение 12 дней больших доз гидрокортизон-ацетата 3,5 мг/100 в геса) и животных с двухсторонней адреналэктомией.

Из данных ряда авторов — Г. М. Соловьева, В. А. Меньшикова и др. (3), Г. М. Поволоцкой (4), Е. В. Флейшман (6) и др. вытекает, что при введении значительных доз кортикостероидов достаточно 7—10 дней, чтобы наступило угнетение функции коры надпочечников. При этом из-за высокой концентрации в крови кортикостероидов приостанавливается выработка АКТГ в гипофизе, вследствие чего снижается синтез гормонов в коре надпочечников и наступает атрофия коркового слоя, особенно пучковой и в меньшей степени сетчатой зоны (Т. Березин, 1; Н. А. Федюшина, В. Е. Ярославский, 5 и др.). Аналогичные явления были установлены и при микроскопическом изучении надпочечников белых крыс, подготавливаемых нами для проведения исследований.

Не находя в доступной нам литературе сведений о влиянии на обменные процессы в ЦНС нейтронного облучения, мы поставили перед собой задачу изучить влияние облучения нейтронами промежуточных энергий (уровень энергий от 0,10 до 0,08 Мэв) в относительно небольшой дозе на активность некоторых ферментов белкового и углеводно-энергетического обмена в субклеточных образованиях головного мозга и некоторые показатели обмена белков и углеводов.

Нейтроны промежуточных энергий играют большую роль в радиационном повреждении организма и вклад их в дозу при нейтронном облучении может быть весьма значительным.

При проведении наших исследований экспериментальными животными служили половозрелые вистеровские крысы стадного разведения весом 160—200 г. Общее нейтронное облучение производилось на специально оборудованном канале реактора ИРТ-2000 Академии наук Белорусской ССР. Мощность дозы в воздухе, создаваемая нейтронами, преимущественно промежуточных энергий, на выходе из канала, где производилось облу-

чение животных, составляет  $\sim 13,5$  рад в час. В течение часа крысы облучались в контейнере из плексигласа, всегда со стороны головы по продольной оси тела, параллельной основному потоку нейтронов.

В качестве общих биологических показателей, свидетельствующих о реакции организма на облучение нейтронами промежуточных энергий, служили: уменьшение привеса облученных животных на протяжении 30 суток после облучения по сравнению с контрольными интактными животными, уменьшение общего количества лейкоцитов в крови, изменение характера эритрограмм и числа эритроцитов, содержание в надпочечниках катехоламинов и аскорбиновой кислоты и ряд других показателей.

Свидетельством реакции со стороны ЦНС на облучение нейтронами промежуточных энергий является достоверное возрастание к 24-у часу после облучения относительной концентрации свободных радикалов в сером и белом веществе больших полушарий головного мозга и мозжечке (рис. 1), изученных методом электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР). Это возрастание

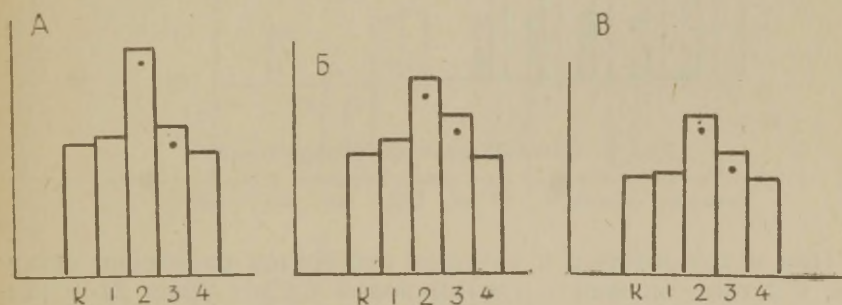


Рис. 1. Относительная концентрация свободных радикалов в тканях облученных крыс через разные сроки после облучения нейтронами в дозе 13 рад. К — контроль; 1 — через 12 часов после облучения; 2 — через 24 часа после облучения; 3 — через 3 суток после облучения; 4 — через 7 суток после облучения. А — серое вещество; Б — белое вещество; В — мозжечок.

было менее выраженное, но достоверное и к третьим суткам после облучения.

Надо полагать, что увеличение концентрации свободных радикалов в результате развития процессов последствия определило возможности биохимических изменений в ЦНС через сутки после облучения, превосходящих эффект, наблюдаемый непосредственно после облучения.

Последнее обстоятельство определило наш интерес к изменениям в ряде биохимических показателей, обнаруживаемых через сутки после облучения.



Исследования, проведенные на субклеточном уровне, показали изменение активности ряда ферментных систем митохондриальной и надссадочной (гиалоплазма и рибосомы) фракций головного мозга после нейтронного облучения.

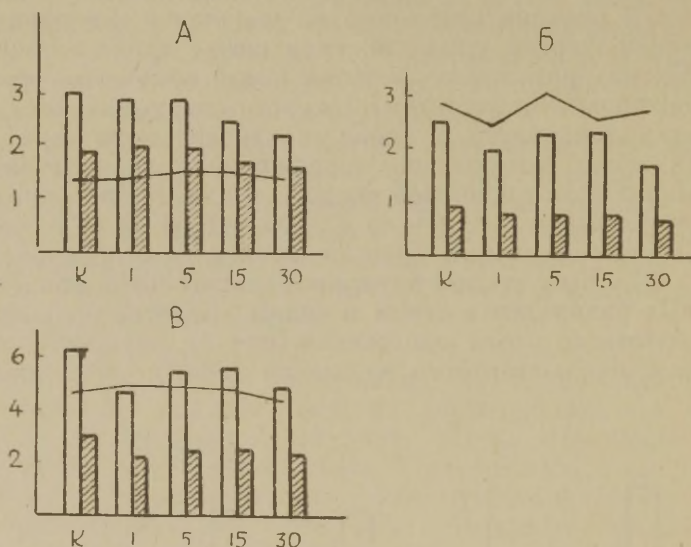


Рис. 2. Окислительное фосфорилирование.

А — янтарная кислота; Б —  $\alpha$ -кетоглутаровая к-та; В — глутаминовая кислота;  $\square$  —  $\Delta P$ ;  $\text{||||}$  —  $\Delta O$ ; — —  $\Delta P/O$ .

При использовании в качестве субстратов окисления янтарной,  $\alpha$ -кетоглутаровой и глутаминовой кислот (рис. 2) в разные сроки после облучения (на 1-е и 30-е сутки для последних двух субстратов и 15-е и 30-е — для сукцината) наступало достоверное снижение процессов фосфорилирования и дыхания, однако сопряжение этих процессов в митохондриях головного мозга не нарушалось. Это говорит о том, что после облучения нейтронами промежуточных энергий в указанной дозе тормозится как процесс потребления кислорода, так и эстерификации АДФ, в результате чего уменьшается синтез АТФ. Отсутствие значимых изменений в содержании АТФ и креатинфосфата мозга в период до 30 суток после облучения может быть результатом снижения их использования в ЦНС, что было ранее показано нами при проведении аналогичных исследований, но с применением  $P^{32}$  при рентгеновском облучении в дозе 40 р.

Уровень окислительного фосфорилирования несколько подавляется в митохондриях мозга после введения гидрокортизона, но это не влияет на сопряженность дыхания и фосфорилирования

и на направленность этих процессов в первые сутки после нейтронного облучения (рис. 3). В этих условиях, однако, происходит значительное и достоверное снижение содержания АТФ в мозговой ткани.

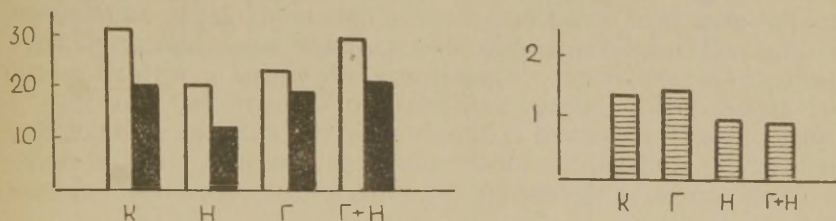


Рис. 3. Окислительное фосфорилирование митохондрий мозга.  
K — контроль; H — нейтронное облучение; Г — введение гидрокортизона;  
□ —  $\Delta P$ ; ■ —  $\Delta O$ ; ▨ —  $\Delta P/O$ .

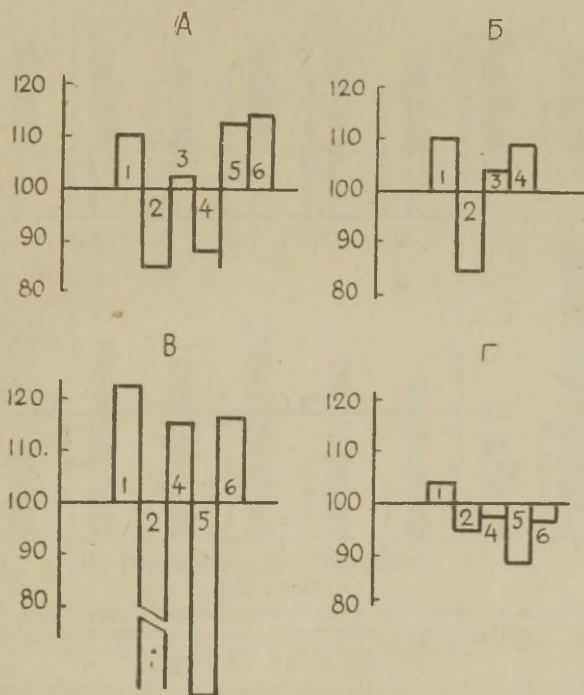


Рис. 4. Активность сукцинатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и АТФазы мозга.

А — активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий; Б — активность цитохромоксидазы митохондрий; В — активность АТФазы митохондрий; Г — активность АТФазы надосадочной жидкости. 1 — нейтронное облучение 1 сутки; 2 — введение гидрокортизона; 3 — введение гидрокортизона и нейтронное облучение; 4 — адреналэктомия; 5 — ложная адреналэктомия; 6 — адреналэктомия и нейтронное облучение.

Активность сукцинатдегидрогеназы (МКФ, 1.3.9.1.) и цитохромоксидазы (МКФ, 1.9.3.1) митохондрий мозга через сутки после нейтронного облучения незначительно возрастает — до 110% и Mg-АТФазы до 122% по сравнению с контролем — и снижается (до 85,6% для сукцинатдегидрогеназы и 86,7% для цитохромоксидазы) при подавлении функции коры надпочечников (рис. 4). Подавление функции надпочечников предупреждает повышение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы через сутки после нейтронного облучения. Активность АТФазы в этих условиях возрастает, что в условиях подавления окислительного фосфорилирования становится причиной снижения содержания в мозговой ткани АТФ, о чем было сказано ранее.

Активность гексокиназы (МКФ, 2.7.1.1.) надосаочной фракции мозга, рассчитанная по убыли глюкозы в мкг на мг белка, достоверно снижалась после нейтронного облучения (рис. 5).

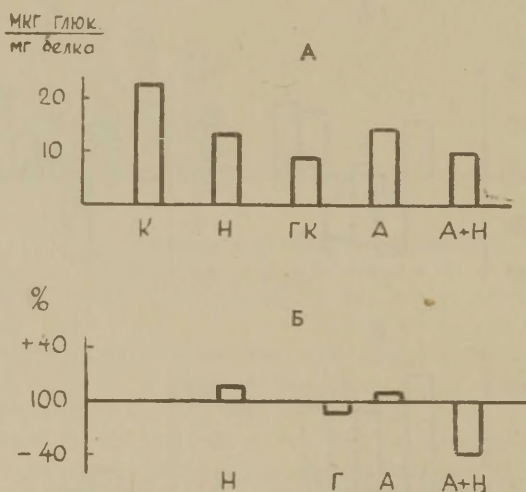


Рис. 5. Активность гексокиназы (А) и альдолазы (Б).

К — контроль; Н — нейтронное облучение; Г — введение гидрокортизона; А — адrenaлэктомия; А + Н — адrenaлэктомия + нейтронное облучение.

Угнетение функции надпочечников приводит к резкому, почти 2-кратному по сравнению с контролем снижению активности гексокиназы. Почти такие же величины характерны и для надосаочной фракции мозга адrenaлэктомированных животных. Нейтронное облучение таких животных приводит к достоверному и более выраженному угнетению активности этого фермента. Альдолазная (МКФ, 4.1.2.7.) активность в надосаочной фракции



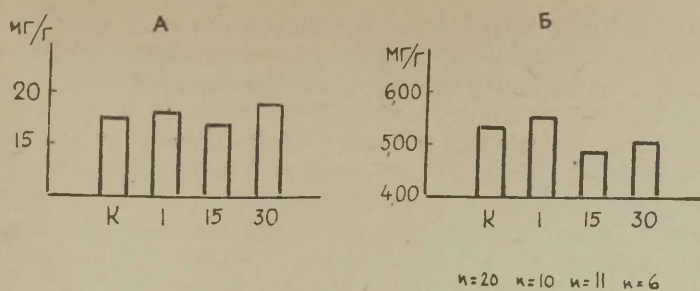


Рис. 6. Содержание ДНП (А) и РНП (Б) мозга.

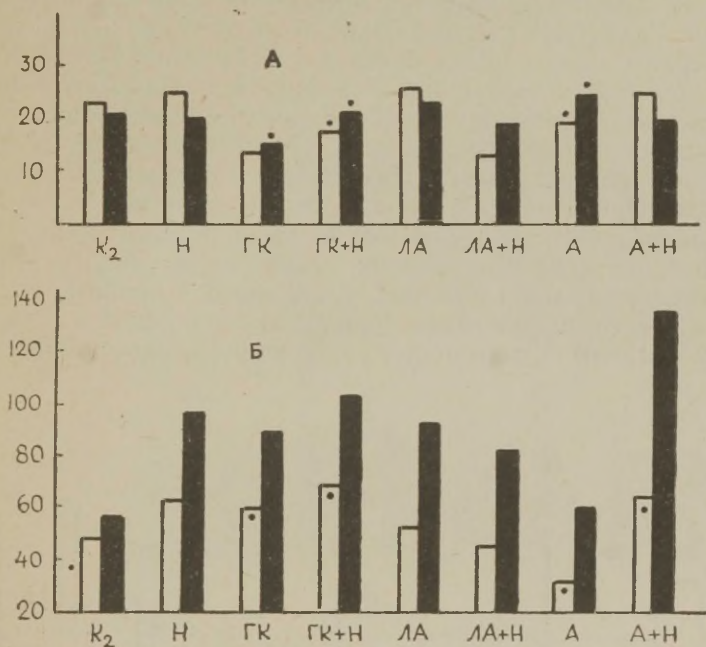


Рис. 7. Активность глутамино-аланиновой (А) и глутамино-аспарагиновой (Б) аминотераз (в колориметрических единицах на мг белка).

□ — митохондрии; ■ — надосадочная жидкость. К — контроль; Н — нейтронное облучение; Г — введение гидрокортизона; А — адреналэктомия; ЛА — ложная адреналэктомия.

мозга не отклоняется от контрольных величин при всех условиях эксперимента и понижается только после облучения адреналэктомизированных животных.

При отсутствии изменений в общем содержании белков мозга и лишь незначительных и недостоверных изменениях в содержа-

нии ДНП и РНП мозга (рис. 6), изменяется активность глутамино-аланиновой (МКФ, 2.6.1.1.) и глутамино-аспарагиновой (МКФ, 2.6.1.2.) аминотрансфераз митохондриальной и надосадоочной фракций мозга (рис. 7).

Через сутки после нейтронного облучения остается неизменной активность глутамино-аланиновой и резко возрастает активность глутамино-аспарагиновой аминотрансфераз митохондрий, и особенно надосадоочной фракции. Подавление функции надпочечников сопровождается снижением процессов трансаминирования с помощью глутамино-аланиновой и, наоборот, повышением трансаминирования глутамино-аспарагиновой аминотрансферазой как в митохондриях, так и в надосадоочной жидкости. Несколько изменяется и реакция этих ферментных систем после облучения животных, которым предварительно вводился гидрокортизон. Резко угнетается активность глутамино-аспарагиновой аминотрансферазы митохондрий мозга после адреналэктомии и в несколько раз возрастает в митохондриях и надосадоочной жидкости после облучения адреналэктомизированных животных.

И, наконец, несколько слов о таком показателе состояния углеводного обмена, как гликоген мозга и о связанных с регуляцией углеводного обмена и медиаторной функцией катехоламинов. К первым суткам после облучения происходит значительное и достоверное снижение общего содержания гликогена, резкое падение содержания гликогена, связанного с белками и липоидами, и менее выраженное снижение свободного гликогена (рис. 8). К 15-ым суткам общее содержание гликогена восстанавли-

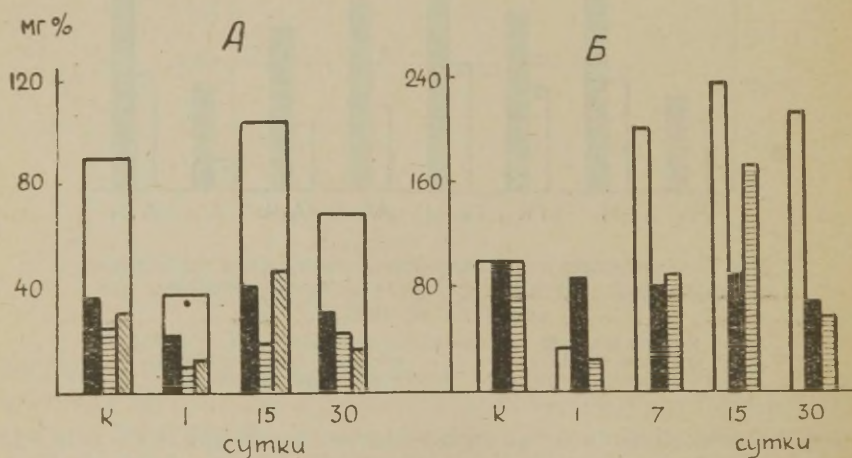


Рис. 8. Фракции гликогена (А) и катехоламины (Б) в % к контролю.  
 А: □ — общий, ▨ — липидный, ■ — свободный ▤ — белковый гликоген.  
 Б: □ — адреналин, ■ — норадреналин, ▨ — продукты окисления.

ливается, но изменяется соотношение между его фракциями за счет уменьшения гликоген-липоидной и возрастания гликоген-белковой и свободной фракций. Нормализации в содержании отдельных фракций гликогена не наступает и к 30-ым суткам после облучения.

Значительные изменения происходят в содержании в мозговой ткани адреналина (А) и норадреналина (НА). В условиях резкого повышения содержания в мозговой ткани А, содержание которого в контроле близко к нулевым величинам и выражается в долях мкг на г ткани, наступают фазные изменения в содержании НА, что отражает реакцию больших полушарий на действие нейтронов промежуточных энергий и свидетельствует о выраженной реакции симпатико-адреналовой системы на воздействие относительно небольших доз облучения.

мг% гликогена  
(сырой вес)

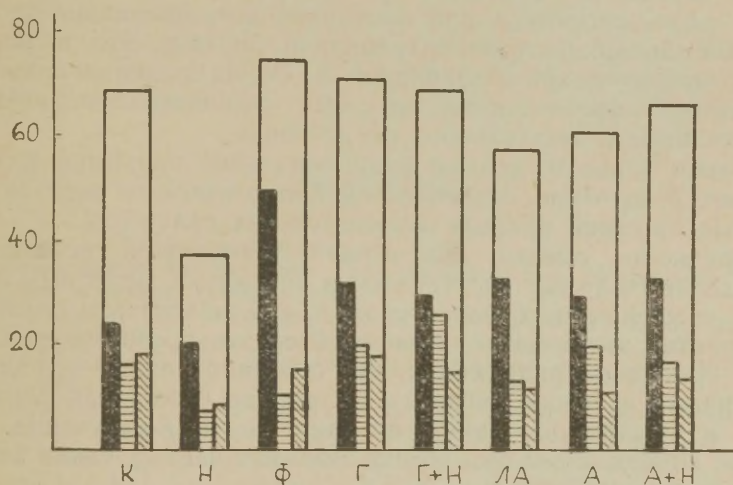


Рис. 9. Фракции гликогена и общий гликоген мозга.

□ — общий, ■ — свободный, ▨ — связанный с липоидами, ▩ — связанный с белками гликоген. К — контроль; Н — нейтронное облучение; Ф — введение физиологического раствора; Г — введение гидрокортизона; ЛА — ложная адреналэктомия; А — адреналэктомия.

Введение гидрокортизона (рис. 9) не вызывает изменения уровня гликогена и его фракций в мозге, однако предварительное введение гидрокортизона предотвращает у облученных животных снижение общего содержания гликогена в мозговой ткани. В этих условиях облучение вызывает и менее выраженное изменение в гликоген-липоидной и, особенно, гликоген-белковой фракции. Сходная картина наблюдается и после адреналэктомии.



Как следует из изложенного, результаты исследований, проведенных на субклеточных фракциях мозга, дают возможность судить о механизмах развития радиационных повреждений ЦНС. Основными участниками этих изменений, определяющими уровень обменных процессов в ЦНС, являются специфические белки-ферменты, структурированные в различных органеллах клетки. Важным фактором, определяющим возможность перераспределения ряда ферментов между митохондриями и гиалоплазмой и др., может быть изменение физико-химических свойств внутрицеллюлярных мембран, что связано не только с прямым, но и с опосредованным действием ионизирующей радиации.

Интересным является и то, что адаптивные ферменты, такие как различные трансаминазы, проявляют это свойство и на уровне ЦНС. При отсутствии изменений в активности ряда ферментов гликолитического цикла и цикла терминального окисления активность глутамино-аланиновой и глутамино-аспарагиновой аминотрансфераз ЦНС изменяется как при действии нейтронного излучения, так и при изменении функционального состояния гипоталамико-адренокортикальной системы. Это, в свою очередь, подтверждает развиваемое А. В. Палладиным положение о различии свойств разных по своим функциям белков ЦНС и необходимости тщательного их изучения.

Таким образом, данные функциональной биохимии мозга помогают в изучении особенностей биологического действия различных по своей природе ионизирующих излучений.

Трудность оценки полученных результатов исследований определяется также отсутствием в организме животных и человека специфических рецепторов и анализаторных систем для восприятия этого фактора внешней среды, превосходящего уровень природной радиации и, что особенно важно — радиаций, различных по своей физической природе, таких как рентгеновское и  $\gamma$ -излучение, корпускулярное  $\alpha$ - и  $\beta$ -излучение, излучение, возникающее при потоке тяжелых частиц, таких как протоны, нейтроны и др.

Обсуждаемое положение усложняется существованием сложной системы опосредования поступающих в животный организм неадекватных и поражающих факторов.

В этом отношении первичный механизм действия радиации усложняется и умножается в организме как через физико-химические и биофизические механизмы, о существовании которых в условиях нашего эксперимента свидетельствовало накопление после нейтронного облучения свободных радикалов в ЦНС, так и через функционально измененные или поврежденные (в зависимости от природы и дозы радиации) системы нейро-гуморальной регуляции.

Использованные нами экспериментальные модели показали в некоторой степени автономность и большую устойчивость об-

менных процессов в ЦНС в отношении их зависимости от уровня кортикостероидов в организме.

Не останавливаясь на обсуждении существующих и развиваемых гипотез о месте приложения кортикостероидов на молекулярном уровне, но учитывая значение в их претворении печени, тимуса и некоторых других систем организма, очевидно, следует высказать предположение о проявлении влияния их на обменные процессы в ЦНС через измененный уровень обмена в указанных выше органах и через них — во всем организме.

В то же время результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что радиационно-биохимические нарушения в ЦНС извращаются и усиливаются в отсутствии нормально-функционирующей гипофизарно-адренокортикоидной системы. Это является одним из косвенных доказательств участия этой системы в осуществлении реакции ЦНС на воздействие ионизирующей радиации, т. е. о существовании сложных систем, обуславливающих вторичный механизм их воздействия.

С помощью примененного нами методического приема удалось выявить особенности действия нейтронов промежуточных энергий и отличия радиационно-биохимических эффектов при облучения последними от таковых при рентгеновском облучении.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Берзин Т., Биохимия гормонов, М., 1964.
2. Биохимия малых доз радиации. Под редакцией Л. С. Черкасовой, Изд-во Наука и техника. Минск, 1964.
3. Соловьев Г. М., Меньшиков В. А., Усватова И. Я., Мещеряков В. В., Гормоны надпочечников в хирургии, М., 1965.
4. Поволоцкая Г. М., Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, 11, 63, 1965.
5. Федюшина Н. А., Ярославский В. Е., Материалы к докладам научной конференции, Кемерово, 1, 80, 1964.
6. Флейшман Е. В., Клиническая медицина, 18, 5, 54, 1965.
7. Черкасова Л. С., Колдобская Ф. Д., Кукушкина В. А., Миронова Т. М., Пикулев А. Т., Тайц М. Ю., Рембергер В. Г., Фомиченко К. В., Хрипченко И. П., Радиобиология и радиотерапия, 6, 4, 339, 1965.

## О ВЛИЯНИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В СПИННОМ МОЗГЕ

А. Д. Рева, Р. И. Кухаренко, Л. П. Руденко, В. Д. Купрюнин

Кафедра биофизики и биохимии Днепропетровского государственного университета, Днепропетровск

В настоящее время накоплен большой фактический материал о «химической топографии и динамике» коры больших полушарий головного мозга (1—6). Четко показана корреляция между структурой, функцией и химизмом.

В этом аспекте большой интерес представляет спинной мозг. В нем имеются четко очерченные гистологические структуры и хорошо изучены функции этих структур (7—11). Что касается биохимии спинного мозга, то мы не встретили систематических исследований, а между тем, здесь на примере спинного мозга имеются большие возможности для всестороннего изучения и сопоставления функции, обмена и структуры отдельных нервных образований. Некоторые данные в этом плане ранее были получены в нашей лаборатории (12—16).

В настоящем сообщении приводятся дополнительные данные по биохимии спинного мозга интактных и облученных рентгеновскими лучами животных. В частности, мы выбрали ряд различной радиочувствительности биохимических показателей химического состава и обмена веществ и проследили динамику их в функционально и гистологически различных областях поясничного утолщения спинного мозга, а именно: в сером веществе передних и боковых рогов, где сгруппированы преимущественно нервные клетки двигательных центров спинномозговых рефлексов задних конечностей; в передних корешках, состоящих преимущественно из аксонов вышеуказанных клеток; в сером веществе задних рогов, состоящем преимущественно из чувствительных, вставочных нейронов; в задних корешках, в состав которых входят преимущественно аксоны нервных клеток спинномозговых ганглиев; и наконец, в белом веществе, представляющем собой восходящие и нисходящие нервные проводящие пути.

Указанная постановка задачи позволяет не только изучать



особенности биохимической организации спинного мозга, но, при сопоставлении полученных данных с физиологическими и биофизическими параметрами, ближе подойти к выяснению биологического механизма действия ионизирующей радиации на ЦНС.

Опыты ставились на кошках. Однократное общее облучение животных или локальное (только поясничного отдела спинного мозга) производили на установке РУМ-11 дозами от 100 до 1200 рентген при следующих условиях: напряжение — 200 кв, анодный ток — 15 ма, фильтры — 0,5 мм Cu, 1 мм Al, кожнофокусное расстояние 50 см, без тубуса, мощность дозы в воздухе 26 р/мин. Биохимические исследования мозга производили через 10 мин, 1 час, 24, 48 часов и 6 суток после облучения животных.

Эффект, вызываемый радиацией, был различен в различных областях поясничного утолщения спинного мозга. Он определяется способом облучения, дозой и временем после облучения.

Ранние изменения (до 10 мин после однократного общего облучения) обнаружены в окислительной способности нервной ткани спинного мозга. Используя метод, предложенный А. С. Мачалиной и Л. Л. Хамайде (17) для определения окислительной способности тканей по интенсивности окисления лейкооснования тионина, нам удалось установить неодинаковую окислительную способность тканей из функционально и морфологически различных областей поясничного утолщения спинного мозга. Результаты этих опытов представлены в таблице 1.

Наиболее высокая способность окислять лейкооснование тионина имеет нервная ткань серого вещества заднего рога, состоящая, как известно, преимущественно из чувствительных клеток вставочных нейронов. Затем в убывающем ряду располагаются нервная ткань, содержащая преимущественно нервные клетки двигательных центров спинномозговых рефлексов задних конечностей (серое вещество переднего рога), передние корешки, задние корешки и, наконец, белое вещество.

Уже через 10 минут и ранее после однократного общего облучения кошек дозой 1200 р наблюдается повышение окислительной способности нервной ткани во всех исследуемых областях спинного мозга. По мере увеличения времени после облучения этой дозой до 6 суток, окислительная способность нервной ткани увеличивалась. Данные табл. 1 показывают, что окислительная способность нервной ткани увеличивается и при гораздо меньших дозах общего облучения животных; так, например, доза 350 р через 1 час значительно повышает окислительную способность нервной ткани целого участка поясничного утолщения по сравнению с контролем.

Локальное облучение только поясничного отдела спинного

Таблица 1

Окислительная активность экстрактов тканей из различных областей поясничного утолщения спинного мозга кошек при различных дозах и сроках после рентгеновского облучения  
(Средние данные из 62 опытов)

Доза и время после облучения	Единицы оптической плотности тионина					
	Целый отдел мозга	ПР*	ЗР	БВ	ПК	ЗК
Контроль	0,073	0,084	0,095	0,047	0,080	0,074
Через 10 минут после однократного общего облучения дозой 1200 р		0,101	0,121	0,075	0,093	0,088
То же через 1 час		0,112	0,130	0,080	0,098	0,090
" " " 12 часов		0,116	0,137	0,089	0,110	0,106
" " " 24 часа		0,125	0,140	0,097	0,117	0,112
" " " 48 часов		0,135	0,148	0,099	0,126	0,112
" " " 6 суток		0,138	0,155	0,103	0,132	0,127
Через 48 часов после однократного локального облучения поясничного отдела спинного мозга дозой 1200 р		0,120	0,133	0,085	0,105	0,097
Через 1 час после однократного общего облучения дозой 800 р		0,106	0,110	0,069	0,090	0,087
То же через 48 часов		0,130	0,145	0,090	0,118	0,105
Через 1 час после однократного общего облучения дозой 600 р	0,116					
То же дозой 350 р	0,109					

\* В таблице и на рисунках использованы обозначения: ПР — серое вещество переднего рога поясничного утолщения спинного мозга; ЗР — заднего рога; БВ — белое вещество; ПК — переднего корешка; ЗК — заднего корешка; ЦМ — целый участок поясничного утолщения спинного мозга.

мозга однократной дозой 1200 р через 48 часов вызывает значительное увеличение окислительной способности исследуемых тканей мозга, однако оно несколько ниже, чем при тех же условиях общего облучения. Это свидетельствует о том, что наблюдаемый эффект при общем облучении животных есть результат не только местных процессов, происходящих в ткани мозга, но зависит также от нарушений, возникающих во всем организме.

Рост окислительной активности тканей мозга в процессе развития лучевого поражения свидетельствует о накоплении в них водорастворимых продуктов окисления. Последние, можно полагать, возникают или же вследствие деструкции и частичной инак-

тивации нормальной антиокислительной активности, наступающей под влиянием облучения (18—22), или же вследствие глубоких изменений ферментативных окислительных процессов (23—25).

В числе ранних радиоактивных эффектов спинного мозга обнаруживаются изменения окислительно-восстановительных (редокс-) потенциалов. Для их регистрации мы использовали ламповый потенциометр ЛП-58. Двухламповый усилитель и чувствительный гальванометр в нем позволяют регистрировать токи в измеряемой цепи в пределах  $1 \cdot 10^{-12}$  а. Столь малые токи не вызывают явления поляризации и дают возможность пользоваться микроэлектродами. Точность измерений потенциометра  $\pm 0,5$  мв. При регистрации окислительно-восстановительных потенциалов спинного мозга подопытные кошки фиксировались в специальном металлическом станке, как и при микроэлектродной технике отведения биоэлектрических потенциалов.

Результаты исследований представлены на рис. 1.

Здесь мы видим, что при расположении каломельного электрода у тела позвонка и погружении отводящего платинового электрода (покрыт эпоксидной смолой, кроме отводящего кон-

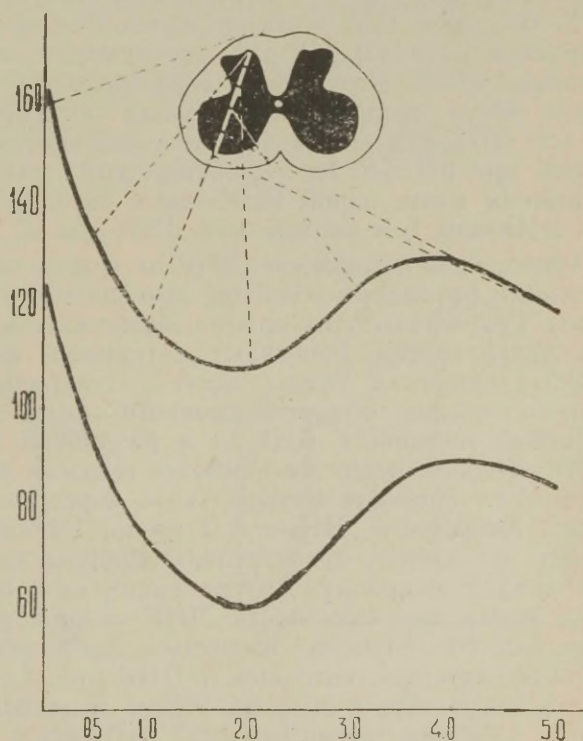


Рис. 1. Изменение окислительно-восстановительного потенциала спинного мозга у нормальных и облученных кошек.

На абсциссе — глубина погружения платинового электрода в дорзентральном направлении L7 сегмента спинного мозга. На ординате — окислительно-восстановительный потенциал в мв. Пунктирные линии указывают величину потенциала в указанных точках мозга. Верхняя кривая — окислительно-восстановительный потенциал спинного мозга необлученных кошек, нижняя кривая — у кошек через 1—5 часов после однократного общего облучения дозой 1200 р.



чика) в дорзовентральном направлении L<sub>7</sub> сегмента спинного мозга обнаруживается различной величины редокс-потенциал. Наиболее высок он на поверхности мозга, несколько ниже в области двигательных центров спинномозговых рефлексов, еще ниже в области чувствительных вставочных нейронов. Обнаруживается корреляция между величиной редокс-потенциала и окислительной активностью мозга в исследуемых областях спинного мозга.

Спустя 1—5 часов после однократного общего облучения кошек дозой 1200 рентген наблюдается достоверное снижение окислительно-восстановительного потенциала (см. рис. 1, нижняя кривая). Наиболее сильное снижение обнаруживается в области вставочных нейронов. В предыдущей серии опытов показана здесь же наиболее высокая окислительная активность нервной ткани, т. е. способность ее отдавать электроны платиновому электроду и тем самым снижать его положительное значение. В области двигательных клеток спинного мозга (глубина электрода 3—4 мм) окислительно-восстановительный потенциал несколько повышается, однако остается значительно ниже его значения на поверхности мозга.

Используя методику горизонтальной вискозиметрии для определения ДНК-аз и спектрофотометрическую методику по Г. А. Нечаевой (26) для определения активности РНК-аз, был определен оптимум рН для деполимераз нуклеиновых кислот спинного мозга. Результаты этих опытов показаны на рис. 2. Здесь четко видна максимальная активность РНК-аз при рН 6,2. ДНК-азы имеют два пика активности, один при рН 7,5, второй при рН 5,5. На основании этого мы полагаем наличие в спинном мозге одной РНК-азы и двух ДНК-аз — щелочной или ДНК-азы I, и кислой или ДНК-азы II.

Определена активность ДНК-аз в функционально и морфологически различных областях поясничного утолщения спинного мозга. Результаты этих опытов представлены на рис. 3. Цифры над диаграммами указывают активность фермента в относительных единицах, буквы внизу — сокращенные обозначения соответствующих областей спинного мозга. Диаграммы характеризуют активность ДНК-аз в различных областях спинного мозга. В сером веществе наиболее высокая активность ДНК-аз, в белом — наиболее низкая, ткань корешков занимает среднее место. Активность ДНК-азы I выше ДНК-азы II.

Эти же данные представлены графически на рис. 4 сплошной линией (жирной). Другие линии на этом рисунке обозначают изменения активности ДНК-аз при различных дозах и сроках после облучения животных. Здесь четко показана более высокая радиочувствительность ДНК-азы II спинного мозга. Все примененные дозы и виды облучения животных вызывают достоверное угнетение ее активности. ДНК-аза I более устойчива к

действию рентгеновского излучения. Достоверное угнетение ее активности обнаруживается при общем облучении дозой 550 р через 48 часов во всех исследуемых областях мозга и в области серого вещества переднего рога при других сроках и дозах облу-

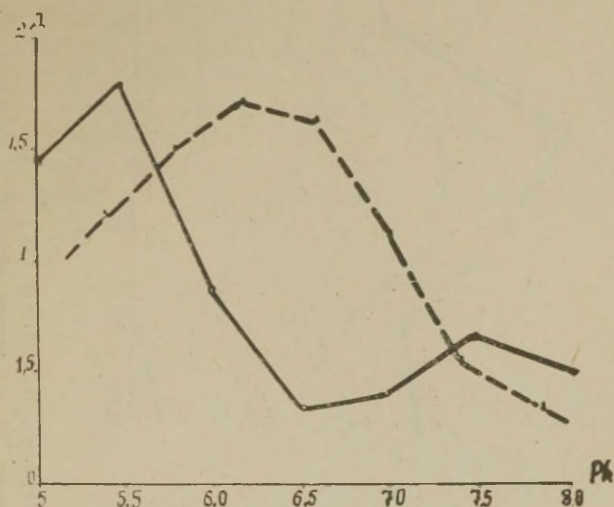


Рис. 2. Активность ДНК-азы и РНК-азы спинного мозга кошек при различных рН.

Абсцисса — значения рН. Ордината — для ДНК-азы: активность в относительных единицах, для РНК-азы: удельная активность. Сплошная линия — активность ДНК-азы, пунктирная — РНК-азы.

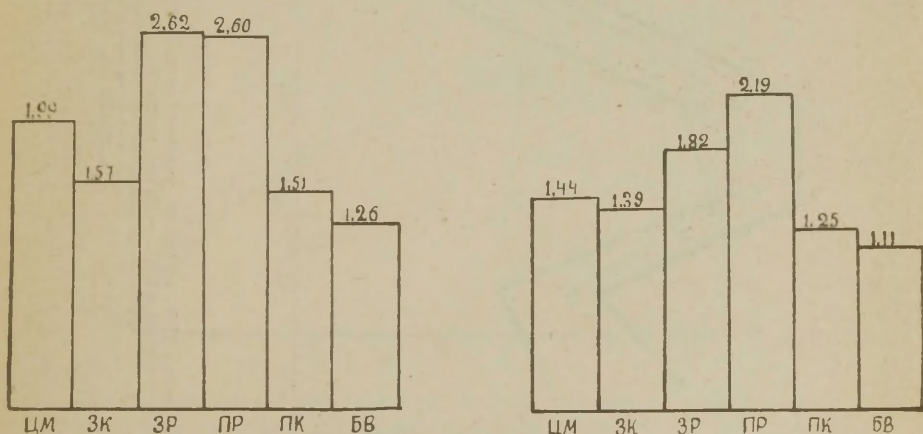


Рис. 3. ДНК-аза I (рН-7,5), ДНК-аза II (рН-5,5).

Активность ДНК-аз в различных областях поясничного утолщения спинного мозга кошек в относительных единицах (средние данные 10 опытов).

По абсциссе: ЦМ — целый участок мозга, ЗК — задний корешок, ЗР — задний рог, ПР — передний рог, ПК — передний корешок, БВ — белое вещество. По ординате — активность в относительных единицах.

.....	контроль (необлученные кошки)	
.....	через 48 час. после общего облучения дозой 550 р.	
.....	через 1 час. " " " " 550 р.	
.....	через 48 час. " " " " 350 р.	
.....	через 48 час. после однократного локального облучения дозой 350 р.	



чения. Однократное локальное облучение поясничного отдела спинного мозга дозой 550 р обуславливает снижение активности фермента только в ткани серого вещества переднего и заднего рога.

На первом-втором часу после общего рентгеновского облучения кошек обнаружены существенные изменения в активности протеолитических ферментов спинного мозга, в частности, активности катепсинов. В наших опытах интенсивность автолиза ткани мозга оценивалась по нарастанию аминного азота, определяемого методом Кукинга и Жема. При этом аминный азот окрашивается нингидрином в присутствии восстановителя (KCN) в метилцеллозолье и при дальнейшем колориметрировании проб.

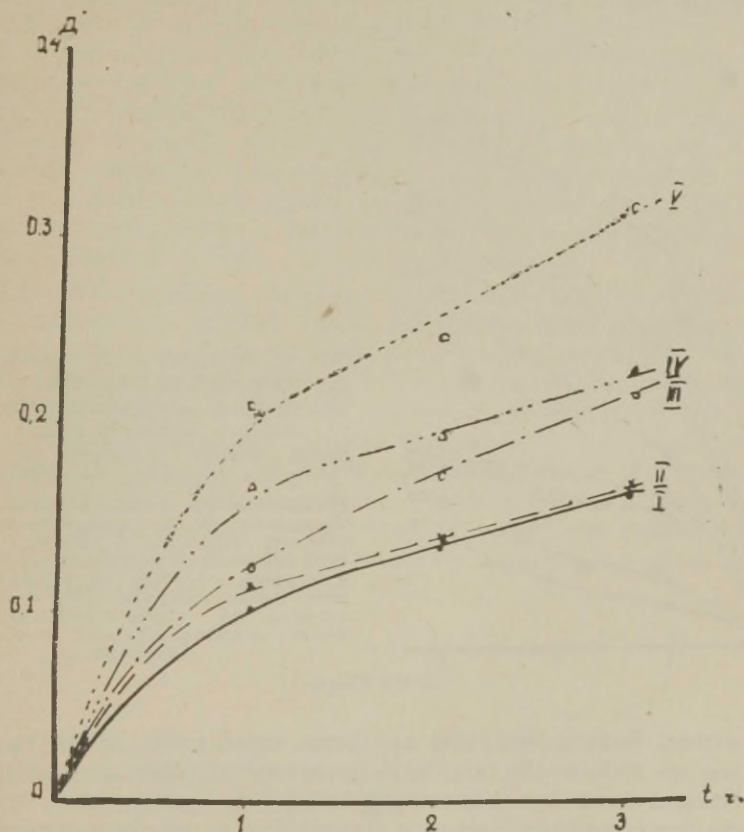


Рис. 5. Автолитическое расщепление белков в поясничном утолщении спинного мозга кошек при различных дозах и сроках после разового облучения.

По абсциссе (t) — время автолиза в часах, по ординате (D) — активность протеолитических ферментов в единицах оптической плотности. I — мозг необлученный, II — через два часа после облучения дозой 350 р, III — то же через 2 суток, IV — через 2 часа после облучения дозой 550 р, V — то же через 4 суток.

На рис. 5 представлены средние данные из 6 опытов в каждой серии. Кривая I показывает автолитическое расщепление белков целого поясничного утолщения спинного мозга необлученных кошек, кривая II — через 2 часа после общего однократного рентгеновского облучения кошек дозой 350 р. Эта доза, как видно из графика, не вызывает существенных изменений в протеолитической активности ферментов мозга через 2 часа после облучения. Однократное общее облучение кошек дозой 550 рентген вызывает повышение протеолитического расщепления белков уже спустя 2 часа после облучения. Как показывает кривая V, на четвертые сутки после облучения автолитическая активность достигает значительной величины по сравнению с нормой.

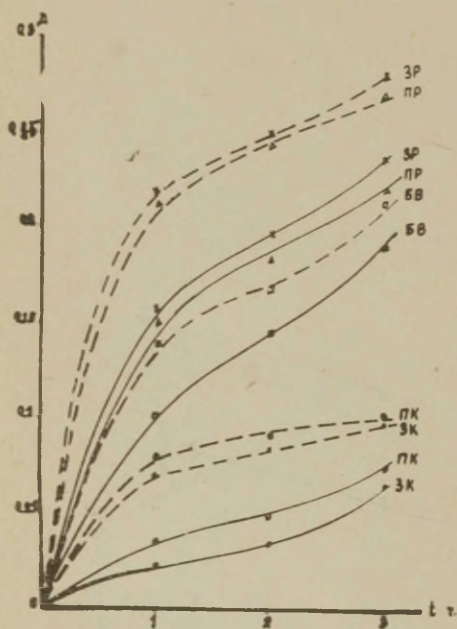


Рис. 6. Автолитическое расщепление белков тканей из различных областей поясничного утолщения спинного мозга кошек в норме и спустя 2 часа после общего разового рентгеновского облучения дозой 550 р.

По абсциссе (t) — время автолиза в часах, по ординате (д) — активность протеолитических ферментов в единицах оптической плотности. Сплошная линия — норма, пунктирная — после облучения. ЗК — ткань заднего корешка, ПК — переднего корешка, БВ — белого вещества, ПР — серого вещества переднего рога, ЗР — заднего рога.

На рис. 6 представлены графики, составленные по средним данным из 8 опытов, показывающие автолитическое расщепление белков тканей в различных областях поясничного утолщения спинного мозга в норме и спустя 2 часа после однократного общего облучения кошек дозой 550 р.

Здесь прежде всего четко показана различная степень автолитического расщепления белков в функционально и морфологически различных областях поясничного утолщения спинного мозга необлученных кошек. В убывающем ряду они располагаются в такой последовательности: серое вещество заднего рога,

серое вещество переднего рога, белое вещество, белое вещество передних корешков, белое вещество задних корешков. После указанной дозы облучения автолитическое расщепление возрастает во всех исследуемых областях спинного мозга по сравнению с нормой, особенно в обоих рогах серого вещества и корешках.

Приведенные данные показывают увеличение активности протеолитических ферментов в центральной нервной системе при однократном общем облучении всего животного, что обуславливает усиленный распад тканевых белков мозга.

Повышение активности протеолитических ферментов может быть результатом непосредственного поражения ионизирующей радиацией внутриклеточных мембран, которые обычно в норме препятствуют хаотическому воздействию ферментов на субстраты. В настоящее время доказано, что клеточные гранулы — «лизосомы» содержат комплекс ферментов, в том числе и катепсины (27). В нормальных физиологических условиях их оболочка удерживает активные ферментные системы. Под действием ионизирующей радиации проницаемость оболочек «лизосом» возрастает, что может быть одним из существенных факторов активации протеолитических ферментов и усиленного распада всех тканевых белков, в том числе и белков мозга.

С другой стороны, показано (28), что усиление протеолитической активности тканей после действия ионизирующей радиации находится под контролем адреналовой системы, так как адреналэктомия животных перед облучением значительно снижает эффект усиления протеолитической активности тканей. Усиленный распад тканевых белков облученных животных несомненно связан также с нарушением деятельности соматического гормона передней доли гипофиза, так как опыты показали, что искусственное введение этого гормона животным после облучения приводит к значительно меньшему падению их веса, хотя и не предохраняет их от гибели (29).

### Заключение

Подтверждается ранее высказанное положение о том, что различные в морфологическом и функциональном отношении области поясничного утолщения спинного мозга имеют различный химический состав и обмен веществ. Показано, что окислительная активность тканей спинного мозга, оцениваемая по способности окислять лейкооснование тионина, различна. Наиболее высокая она в сером веществе заднего рога, несколько ниже в сером веществе переднего рога, затем в убывающем ряду идет ткань переднего корешка, заднего корешка, и на последнем месте ткань белого вещества.



Воздействие различными дозами однократного общего и локального рентгеновского облучения вызывает достоверное увеличение окислительной способности тканей во всех изучаемых областях поясничного отдела спинного мозга. По мере увеличения времени после облучения окислительная активность тканей мозга увеличивается. Все это свидетельствует о накоплении в тканях облученных животных, в том числе и в мозгу водорастворимых продуктов окисления. Последние возникают, можно полагать, или же вследствие инактивации нормальной антиокислительной активности или же вследствие нарушения ферментативных окислительных процессов.

Накопление в тканях облученных организмов продуктов окисления непосредственно влияет на величину окислительно-восстановительного потенциала. Используя потенциометрическую методику регистрации редокс-потенциалов, обнаружены различные значения его в разных областях спинного мозга и достоверное снижение во всех исследуемых областях в течение 1—5 часов после облучения животных тотальной дозой.

Методом горизонтальной вискозиметрии показано наличие в спинном мозге двух ДНК-аз — щелочной или I, и кислой или II. Более активна щелочная РНК-аза. В сером веществе спинного мозга активность ДНК-аз более высокая, чем в тканях корешков и белого вещества. Более радиочувствительной является ДНК-аза II, ее активность угнетается уже при дозе 350 р. Активность ДНК-азы I угнетается при дозе 550 р. Чем больше доза и время после облучения, тем больше угнетается активность ДНК-аз. Активность ДНК-азы I в сером веществе переднего рога угнетается после облучения раньше и при меньших дозах, чем в других областях поясничного утолщения спинного мозга.

Показано неодинаковое автолитическое расщепление белков тканями из различных областей поясничного утолщения спинного мозга необлученных кошек. Наиболее высокая автолитическая активность в ткани серого вещества заднего рога, затем в убывающем ряду располагаются: ткань серого вещества переднего рога, белого вещества, переднего корешка, заднего корешка. Облучение животных рентгеновскими лучами обуславливает увеличение автолитического расщепления белков тканями во всех исследуемых областях мозга. Автолитическое расщепление белков спинного мозга находится в прямой зависимости от дозы и срока после облучения.

Увеличение активности протеолитических ферментов после облучения животных обуславливает усиленный распад тканевых белков мозга.

Представленные результаты исследований свидетельствуют о ранних, существенных нарушениях в обмене веществ в спинном мозге облученных животных.

Анализ и сопоставление их с другими биохимическими и биофизическими показателями и параметрами спинного мозга в различные сроки после облучения различными дозами позволит ближе подойти к раскрытию биологического механизма действия радиации на мозг и познанию лучевой болезни.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., Хайкина Б. И., В кн.: Успехи биол. химии, **II**, 27, Медгиз, М., 1954.
2. Войнар А. О., Русанов А. К., Биохимия, **14**, 102, 1949.
3. Дорфман С. И., Шипицын С. А., Биохимия, **20**, 136, 1955.
4. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, Киев, 1965.
5. Владимиров Г. Е., Пантелева Н. С., Функциональная биохимия, ЛГУ, 1965.
6. Палладин А. В., Укр. биохим. ж., **31**, 5, 1959.
7. Экклс Дж., Физиология нервных клеток, ИЛ, 1959.
8. Экклс Дж., Физиология синапсов. Изд. Мир., 1966.
9. Костюк П. Г., Двухнейронная рефлекторная дуга, М., 1959.
10. Костюк П. Г., В кн.: Основные вопросы электрофизиологии центральной нервной системы, АН УССР, 1962.
11. Костюк П. Г., В кн.: Современные проблемы электрофизиол. исследований нервной системы. Изд. Мед., 1954.
12. Рева А. Д., Биохимия, **23**, 809, 1958.
13. Рева А. Д., Тр. IX Всесоюзного съезда физиологов, биохимиков, фармакологов, 194, М., 1959.
14. Рева А. Д., Бюллетень эксп. биол. и мед., **7**, 60, 1960.
15. Рева А. Д., Биохимия **25**, вып. 2, 285, 1960.
16. Рева А. Д., Украинский биохимический съезд, Черновицы, 1965.
17. Мочалина А. С., Хамайде Л. Л., Радиобиология, **4**, в. 4, 487,, 1964.
18. Мальц В., Биофизика, **5**, 546, 1960.
19. Varberg A. A., Wilbur K. M., Radiation Res., **10**, 2, 167, 1959.
20. Шевалье А., Борг К., В кн.: Вопросы радиобиологии, **11**, ИЛ, М., 1956.
21. Тартусов Б. Н., Первичные процессы лучевого поражения. Атомиздат, М., 1962.
22. Журавлев А. И., Первичные механизмы биологического действия ионизирующего излучения. Тез. докл. Моск. об-ва испытат. природы, М., **24**, 1960.
23. Пасынский А. Г., Радиобиология, **1**, 3, 1961.
24. Кузин А. М., Радиационная биохимия. Изд. АН СССР, М., 1962.
25. Кузин А. М., Бронская Л. М., Березина Н. М., Языкова В. А., В кн.: Роль перекисей и кислорода в начальных стадиях радиобиологического эффекта, **33**. Изд-во АН СССР, М., 1960.
26. Нечаева Г. А., Укр. биохим. ж., **36**, 4, 607, 1964.
27. De Duve Chr., Bull. Acad. Med. Belg. vith. Ser. V. **23**, 608, 1958.
28. Граевская Б. М., Кейлина Р. Я., Мед. радиология, **4**, 3, 21, 1959.
29. Гродзенский Д. Э., Раткина А. Е., Баграмян Э. Р., Проблемы эндокринологии и гормонотерапии, **4**, 71, 1958.

# ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА БИОСИНТЕЗ РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Б. Ф. Сухомлинов, Я. Г. Шевчук

Кафедра биохимии Львовского ордена Ленина государственного  
университета им. Ив. Франко, Львов

Работами академика А. В. Палладина и его школы установлено, что обмен белков в головном мозгу взаимосвязан с функцией ЦНС, ибо со структурой белков и их обменом связаны специфика и сам характер деятельности ЦНС (1, 2). Исследованиями ряда авторов (3—12, 17) тоже показано, что ионизирующие излучения вызывают существенные морфологические и функциональные изменения в головном мозгу. Вместе с тем механизм этих процессов до сих пор остается не выясненным.

Допустимо предположить, что в основе функциональных нарушений ЦНС при воздействии ионизирующей радиации лежат физико-химические и структурные изменения, а также нарушения биосинтеза растворимых белков тканей головного мозга, как наиболее чувствительных к действию ионизирующих излучений.

Выяснению физико-химических механизмов лучевого поражения ЦНС и изучению закономерностей нарушения биосинтеза растворимых белков, заключенных в отдельные электрофоретические фракции серого и белого вещества головного мозга, при тотальном рентгеновском облучении и посвящено настоящее исследование.

## Методика

Опыты проведены на кроликах весом 2,0—2,5 кг. Тотальное облучение животных осуществлялось на аппарате РУМ-II дозой в 1000 р при следующих условиях: напряжение — 170 кв, сила тока — 20 ма, расстояние — 58 см, фильтр — 0,5 мм Си, мощность дозы — 17 р/мин. Животные забивались в разные сроки после облучения (на 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 дни).

Растворимые белки мозга получали по методу, разработанному в лаборатории С. Я. Капланского (13) с последующим их сгущением (16).

Исследовали растворимые белки серого и белого вещества головного мозга в динамике в различные сроки после облучения.



Электрофорез растворимых белков проводился в агаровом геле по ранее описанной методике (14).

О биосинтезе белков судили по радиоактивности  $S^{35}$ -метионина, включенного в различные электрофоретические фракции. Радиометионин вводили животным подкожно из расчета 120 тыс. имп./мин на 1 г живого веса. Время между введением  $S^{35}$ -метионина и взятием органа на исследование составляло 19 часов. Окрашенные электрофореграммы использовались для получения автордиограмм на высокочувствительной рентгеновской пленке.

Денситометрия электрофореграмм и автордиограмм осуществлялась на микрофотометре ИФ-2. Измерялась радиоактивность общего белка (из расчета на 10 мг).

По данным электрофоретических и автордиографических исследований, а также радиоактивности 10 мг общего белка рассчитывали радиоактивность различных фракций растворимых белков в пересчете на 10 мг сухого веса (15).

Электрофоретическую подвижность фракций растворимых белков тканей сопоставляли с электрофоретической подвижностью белковых фракций сыворотки крови кроликов при одинаковых условиях исследования.

Результаты опытов систематизировались и обрабатывались статистически.

## Результаты исследований

Исследования электрофоретического спектра растворимых белков серого и белого вещества головного мозга интактных животных показали, что их белковый спектр состоит из 16 электрофоретических фракций.

Причем одна из них расположена перед альбуминами сыворотки крови, одна за  $\gamma$ -глобулинами сыворотки крови, а остальные находятся в зонах подвижности альбуминов и глобулинов сыворотки крови.

В таблицах 1 и 2 представлены качественные и количественная характеристики электрофоретических фракций растворимых белков серого и белого вещества головного мозга интактных и облученных животных, забитых в разные сроки после облучения.

У интактных кроликов отмечено высокое содержание белка в электрофоретических фракциях в зоне подвижности  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов сыворотки крови, а также преальбуминов сыворотки крови (серое вещество — 7,21%; белое вещество — 9,50%).

У облученных животных в электрофоретическом спектре растворимых белков серого и белого вещества головного мозга наблюдаются значительные качественные и количественные изменения. Для качественных изменений характерно выпадение  $\alpha_3$ -глобулиновой фракции в зоне подвижности  $\alpha$ -глобулинов сыворотки крови.

Наиболее характерные качественные изменения в электрофоретическом спектре отмечены в первые дни и в момент развития лучевой болезни. Так, на 1-й, 3-й, 6-й, 12-й и 18-й дни после облучения в спектре растворимых белков серого и белого вещества головного мозга установлены дополнительные фракции в зоне подвижности  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов.

Процентное соотношение электрофоретических фракций растворимых белков серого вещества головного мозга  
(облучение 1000 p)

№ фракция	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракции сывороточных белков	Конт-роль		Дни после облучения															
				1-й		3-й		6-й		9-й		12-й		15-й		18-й		21-й	
		М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$
1.	Преальбумины	7.21	0.80	6.94	0.11	12.05	0.46	11.90	0.18	5.06	0.01	8.48	1.32	10.04	0.05	12.85	1.12	8.78	0.12
3.	Неидентифиц.	4.09	0.24	4.88	0.11	4.30	0.13	2.57	0.26	4.64	0.13	2.89	0.31	2.55	0.09	2.38	0.27	2.97	0.16
2.	Альбумины	4.72	0.03	2.50	0.08	1.90	0.16	2.02	0.13	4.51	0	2.30	0.12	4.25	0.13	6.23	0.60	1.79	0.05
4.	$\alpha_1$ -глобулины	5.75	0.34	3.67	0.30	3.16	0.23	3.15	0.04	5.36	0.27	7.17	0.29	7.24	0.15	5.77	0.80	2.61	0.08
	$\alpha_1'$ -глобулины	—	—	3.13	0.07	4.27	0.27	4.35	0.09	—	—	—	—	—	—	4.93	0.33	4.33	0.35
5.	$\alpha_2$ -глобулины	7.87	0.89	5.69	0.45	6.09	0.38	5.59	0.17	6.00	0.28	17.30	0.53	8.03	0.17	6.32	0.73	8.19	0.27
6.	$\alpha_2'$ -глобулины	7.37	0.11	11.24	0.40	8.87	0.18	6.91	0.15	7.76	0.31	—	—	6.20	0.10	10.78	0.87	7.63	0.25
	$\alpha_2''$ -глобулины	—	—	—	—	—	—	7.66	0.20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	8.41	0.22	14.72	0.29	9.03	0.25	14.60	0.10	7.10	0.19	12.36	1.76	16.40	0.65	15.58	1.66	12.18	0.20
8.	$\alpha_3'$ -глобулины	12.98	0.69	—	—	—	—	—	—	6.56	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	12.66	0.99	10.24	0.28	19.49	0.99	6.34	0.33	20.40	0.60	17.77	1.51	14.87	0.12	12.44	0.57	20.14	0.40
10.	$\beta_2$ -глобулины	6.52	0.12	5.20	0.16	7.14	0.20	5.17	0.17	4.94	0.13	3.88	0.54	8.50	0.28	6.73	0.49	9.11	0.17
	$\beta_2'$ -глобулины	—	—	6.52	0.54	5.06	0.08	6.20	0.11	—	—	6.98	0.20	—	—	—	—	—	—
11.	не-идентифицированы	4.22	0.32	2.55	0.01	3.15	0.33	3.56	0.71	4.53	0.17	3.78	0.28	4.54	0.12	3.00	0.09	3.97	0.23
12.		4.03	0.33	1.74	0.02	1.75	0.23	3.06	0.24	5.05	0.08	2.29	0.17	4.03	0.09	2.34	0.17	3.22	0.07
		—	—	2.03	0.14	—	—	—	0.10	—	—	—	—	1.76	0.04	—	—	3.24	0.25
	$\gamma_0$	—	—	—	—	1.41	0.03	2.84	—	—	—	—	—	—	—	1.24	0.09	—	—
13.	$\gamma_1$	7.52	0.73	8.02	0.17	3.59	0.07	4.96	0.06	9.31	0.09	5.20	0.70	5.20	0.12	3.80	0.27	5.60	0.13
	$\gamma_1'$	—	—	—	—	4.58	0.02	3.94	0.10	—	—	—	—	—	—	2.40	0.10	—	—
14.	$\gamma_2$	2.69	0.26	3.38	0.19	1.22	0.17	1.68	0.22	3.84	0.03	4.10	0.14	2.77	0.17	1.42	0.22	2.72	0.03
	$\gamma_2'$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.00	0.32	—	—	—	—	—	—
15.	$\gamma_3$	2.23	0.27	3.88	0.18	1.97	0.24	1.94	0.15	3.30	0.05	1.72	0.38	2.02	0.01	0.80	0.20	2.06	0.01
16.	За- $\gamma$ -глобулинами	1.73	0.20	3.67	0.18	0.97	0.12	1.56	0.03	1.64	0.01	0.78	0.11	1.60	0.05	0.99	0.11	1.46	0.01

Процентное соотношение электрофоретических фракций растворимых белков белого вещества головного мозга (облучение 1000 р)

№ фракции	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракция сывороточных белков	Конт-роль		Дни после облучения															
				1-й		3-й		6-й		9-й		12-й		15-й		18-й		21-й	
		М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$
1.	Преальбумины	9.50	0.44	6.34	0.58	8.93	0.69	10.10	0.51	8.31	0.10	6.54	0.03	9.67	0.46	5.12	0.79	6.35	0.40
2.	Альбумины	3.21	0.12	4.10	0.31	3.31	0.19	2.32	0.04	2.68	0.06	3.44	0.41	3.12	0.05	12.36	0.18	3.53	0.19
3.	Неидентифиц.	3.25	0.19	2.64	0.20	1.84	0.04	2.31	0.07	3.96	0.03	2.56	0.32	3.66	0.08	2.29	0.42	4.80	0.10
4.	$\alpha_1$ -глобулины	4.87	0.09	4.26	0.23	4.91	0.24	3.27	0.16	5.87	0.11	5.76	0.30	5.30	0.13	3.20	0.29	4.96	0.35
	$\alpha'_1$ -глобулины	—	—	5.10	0.13	7.25	0.31	3.64	0.14	—	—	—	—	—	—	5.72	0.29	—	—
5.	$\alpha_2$ -глобулины	8.03	0.42	5.60	0.15	7.17	0.45	6.20	0.19	6.20	0.21	16.77	0.50	6.09	6.06	7.29	0.70	7.00	0.15
6.	$\alpha'_2$ -глобулины	9.62	0.22	9.00	0.59	10.20	0.84	8.76	0.16	5.77	0.01	—	—	—	0.30	11.33	0.91	6.51	0.44
	$\alpha''_2$ -глобулины	—	—	—	—	—	—	11.26	0.56	—	—	—	—	7.51	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	13.94	0.60	10.75	0.70	9.23	0.48	12.53	0.12	9.96	0.10	17.04	1.26	18.28	0.05	18.26	1.07	11.51	0.80
8.	$\alpha'_3$ -глобулины	11.40	0.25	—	—	14.79	—	—	—	14.22	0.05	—	—	—	—	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	9.46	0.23	12.68	0.50	—	0.26	8.88	0.20	17.21	0.65	11.53	1.29	12.46	0.38	12.60	0.54	19.49	0.67
10.	$\beta_2$ -глобулины	6.87	0.54	9.79	0.78	7.80	0.48	5.97	0.11	4.02	0.39	3.79	0.40	9.23	0.12	5.99	0.33	8.58	0.48
	$\beta'_2$ -глобулины	—	—	5.53	0.42	6.62	0.60	6.00	0.08	—	—	5.90	0.34	—	—	—	—	—	—
11.	не-идентифици- рованы	3.40	0.11	3.88	0.45	3.32	0.29	3.36	0.06	2.44	0.01	2.68	0.29	3.16	0.05	2.79	0.21	3.67	0.06
12.		2.70	0.12	2.95	0.27	2.03	0.34	1.99	0.10	2.94	0.06	4.42	0.37	1.82	0.00	2.32	0.11	1.99	0.11
		—	—	2.18	0.11	—	—	—	—	—	—	—	—	3.56	0.18	—	—	4.31	0.10
	$\gamma_0$	—	—	—	—	1.04	0.05	3.43	0.14	—	—	—	—	—	—	0.94	0.07	—	—
13.	$\gamma_1$	6.21	0.20	7.66	0.17	3.25	0.27	4.09	0.22	6.73	0.30	7.20	0.27	4.83	0.07	3.28	0.32	9.24	0.25
14.	$\gamma_2$	2.50	0.15	2.57	0.09	3.83	0.58	2.54	0.16	3.57	0.08	5.91	0.45	6.25	0.23	1.98	0.15	2.53	0.08
	$\gamma'_2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.74	0.20	—	—	0.95	0.09	—	—
15.	$\gamma_3$	3.12	0.04	3.15	0.19	1.59	0.19	2.32	0.14	4.24	0.03	1.58	0.11	3.32	0.15	2.26	0.20	3.25	0.02
	$\gamma'_3$	—	—	—	—	1.93	0.56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16.	За $\gamma$ -глобу- линами	1.92	0.09	1.82	0.78	0.96	0.25	1.03	0.14	1.88	0.08	1.14	0.14	1.74	0.04	1.32	0.06	2.28	0.15



Процентное соотношение электрофоретических фракций растворимых белков серого вещества головного мозга по включению  $S^{35}$ -метионина (облучение 1000 p)

№ фракции	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракция сывороточных белков	Конт-роль		Дни после облучения															
				1-й		3-й		6-й		9-й		12-й		15-й		18-й		21-й	
		М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$
1.	Преальбумины	11.27	0.70	12.22	0.78	11.33	0.10	13.00	0.48	7.86	0.25	8.96	1.32	11.28	0.06	12.77	1.09	13.86	0.14
2.	Альбумины	5.86	0.24	5.70	0.27	5.14	0.36	3.17	0.03	7.17	0.14	3.25	0.11	4.11	0.07	2.99	0.20	5.92	0.27
3.	Неидентифиц.	4.05	0.17	3.30	0.12	3.23	0.03	2.86	0.09	6.44	0.27	2.80	0.07	4.70	0.15	5.50	0.45	2.64	0.23
4.	$\alpha_1$ -глобулины	6.46	0.28	3.76	0.11	4.29	0.40	3.84	0.20	6.40	0.22	6.98	0.05	7.26	0.23	5.55	0.34	4.12	0.09
	$\alpha_1'$ -глобулины	—	—	3.22	0.12	4.43	0.40	4.66	0.12	—	—	—	—	—	—	5.35	0.42	6.08	0.38
5.	$\alpha_2$ -глобулины	7.10	0.19	4.08	0.11	5.27	0.35	6.07	0.16	6.40	0.22	15.94	0.45	6.68	0.15	7.82	0.63	7.28	0.35
6.	$\alpha_2'$ -глобулины	8.23	0.82	8.13	0.60	6.51	0.41	6.94	0.41	5.64	0.02	—	—	8.06	0.49	11.54	0.54	7.58	0.26
	$\alpha_2''$ -глобулины	—	—	—	—	—	—	8.50	0.39	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	13.68	0.38	12.92	0.65	5.90	0.41	13.03	0.52	5.40	0.26	10.66	1.38	17.86	0.46	20.63	1.03	12.76	0.48
8.	$\alpha_3'$ -глобулины	12.57	1.00	—	—	—	—	—	—	6.44	0.09	—	—	—	—	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	6.80	0.49	7.44	0.11	10.60	0.83	8.56	0.51	19.74	0.02	19.69	0.21	14.11	0.46	11.96	0.73	17.23	0.16
10.	$\beta_2$ -глобулины	—	0.36	4.75	0.08	5.80	0.25	5.22	0.09	4.62	0.01	4.38	0.13	7.56	0.42	5.83	0.99	7.22	0.21
	$\beta_2'$ -глобулины	—	—	4.82	0.51	4.80	0.14	5.46	0.08	—	—	6.98	0.40	—	—	—	—	—	—
11.	не-идентифицированы	3.24	0.17	3.28	0.16	3.92	0.08	2.78	0.14	3.10	0.02	3.36	0.09	3.45	0.04	2.27	0.16	3.76	0.20
12.		3.27	0.10	2.54	0.13	3.28	0.20	2.34	0.04	3.84	0.07	2.26	0.16	3.45	0.07	1.84	0.19	2.13	0.10
		—	—	3.14	0.13	—	—	—	—	—	—	—	—	2.02	0.11	—	—	2.66	0.23
	$\gamma_0$	—	—	—	—	3.98	0.04	2.23	0.08	—	—	—	—	—	—	1.16	0.09	—	—
13.	$\gamma_1$	4.68	0.40	8.57	0.38	5.06	0.34	3.68	0.09	7.43	0.06	4.92	0.22	3.94	0.26	1.85	0.15	3.45	0.26
	$\gamma_1'$	—	—	—	—	5.32	0.00	3.03	0.15	—	0.06	—	—	—	—	1.80	0.27	—	—
14.	$\gamma_2$	2.38	0.22	2.76	0.30	3.01	0.16	1.39	0.04	5.38	—	4.05	0.34	3.00	0.01	0.88	0.26	1.83	0.13
	$\gamma_2'$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.52	0.21	—	—	—	—	—	—
15.	$\gamma_3$	1.21	0.10	3.98	0.19	3.72	0.23	1.49	0.03	3.11	0.02	1.17	0.04	1.36	0.03	0.29	0.05	0.54	0.02
16.	За $\gamma$ -глобулинами	0.97	0.06	5.38	0.35	4.41	0.10	1.75	0.15	1.03	0.01	1.08	0.14	1.16	0.05	0.70	0.10	0.94	0.05

Процентное соотношение электрофоретических фракций растворимых белков белого вещества головного мозга по включению  $S^{35}$ -метионина (облучение 1000 p)

№ фракции	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракция сывороточных белков	Контроль		Дни после облучения															
				1-й		3-й		6-й		9-й		12-й		15-й		18-й		21-й	
		М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$	М	$\pm m$
1.	Преальбумины	13.45	0.61	8.86	0.30	10.55	0.15	12.69	0.22	10.21	0.21	9.96	0.33	10.65	0.45	12.53	0.39	11.70	0.35
2.	Альбумины	4.82	0.04	6.76	0.33	5.54	0.27	4.54	0.11	5.49	0.07	5.33	0.12	4.72	0.03	3.11	0.12	7.72	0.40
3.	Неидентифиц.	3.99	0.23	4.30	0.09	3.50	0.15	3.38	0.11	5.49	0.07	3.50	0.12	4.48	0.10	3.12	0.07	6.42	0.17
4.	$\alpha_1$ -глобулины	5.22	0.47	3.32	0.03	3.50	0.24	4.61	0.06	5.28	0.10	6.28	0.32	5.16	0.35	4.09	0.11	5.02	0.28
	$\alpha'_1$ -глобулины	—	—	4.77	0.04	4.86	0.30	4.96	0.10	—	—	—	—	—	—	6.1	0.12	—	—
5.	$\alpha_2$ -глобулины	9.16	0.12	4.38	0.44	5.67	0.04	5.40	0.32	6.53	0.02	17.12	0.17	6.70	0.49	7.07	0.47	6.35	0.41
6.	$\alpha'_2$ -глобулины	9.48	0.78	6.76	0.66	4.93	0.12	7.26	0.27	4.78	0.05	—	—	6.22	0.17	15.72	0.52	5.73	0.19
	$\alpha''_2$ -глобулины	—	—	—	—	—	—	8.16	0.30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	12.01	0.50	6.98	0.10	—	0.17	12.70	0.41	7.95	0.01	11.90	0.28	21.34	0.61	23.08	0.45	13.02	0.15
8.	$\alpha'_3$ -глобулины	12.98	0.13	—	—	4.73	—	—	—	13.25	0.01	—	—	—	—	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	10.61	0.06	12.65	0.74	11.66	0.54	9.34	0.45	14.56	0.32	10.79	0.41	14.41	0.05	11.50	0.31	16.42	0.57
10.	$\beta_2$ -глобулины	5.30	0.19	6.69	0.17	5.97	0.46	5.55	0.26	4.78	0.05	3.84	0.09	6.88	0.08	3.71	0.10	7.08	0.03
	$\beta'_2$ -глобулины	—	—	4.65	0.09	5.15	0.14	4.35	0.20	—	—	5.49	0.34	—	—	—	—	—	—
11.	неидентифицированы	2.51	0.05	4.04	0.28	4.64	0.19	2.04	0.05	2.46	0.06	2.28	0.18	2.57	0.14	1.66	0.03	2.00	0.14
12.		3.03	0.11	4.27	0.10	3.58	0.18	1.47	0.8	2.30	0.01	2.64	0.13	2.36	0.10	2.12	0.17	3.00	0.01
		—	0.11	3.54	0.18	—	—	—	—	—	—	—	—	3.33	0.04	—	—	4.87	0.11
	$\gamma_0$	—	0.11	—	—	3.43	0.14	3.33	0.25	—	—	—	—	—	—	0.97	0.06	—	—
13.	$\gamma_1$	3.36	0.26	5.48	0.19	5.06	0.34	3.40	0.19	6.72	0.04	5.46	0.47	2.72	0.11	1.64	0.06	5.83	0.21
14.	$\gamma_2$	2.09	0.09	2.90	0.15	4.68	0.05	3.00	0.28	5.96	0.20	5.57	0.26	6.07	0.07	1.58	0.07	2.64	0.02
	$\gamma'_2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.49	0.24	—	—	0.53	0.02	—	—
15.	$\gamma_3$	0.84	0.05	3.82	0.07	3.17	0.12	2.06	0.22	3.53	0.03	2.80	0.11	1.34	0.11	0.80	0.03	—	0.11
	$\gamma'_3$	—	—	—	—	4.83	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.86	—
16.	За $\gamma$ -глобулинами	1.15	0.05	5.83	0.04	4.55	0.26	1.76	0.22	0.71	0.01	3.25	0.23	0.98	0.06	0.63	0.07	1.32	0.01



Воздействие ионизирующего излучения вызывает и количественные изменения в электрофоретическом спектре растворимых белков серого и белого вещества головного мозга. Было отмечено увеличение процентного соотношения белковых фракций, соответствующих по неподвижности  $\gamma$ -глобулинам сыворотки крови. Это увеличение особенно выражено на 6-й и 12-й дни лучевой болезни. Изменения процентного соотношения фракций растворимых белков серого и белого вещества головного мозга, расположенных в зоне преальбуминов, альбуминов и фракции, лежащей за  $\gamma$ -глобулинами, а также неидентифицированной (3-я фракция), носят волнообразный характер. Этот волнообразный характер в количественном изменении процентного соотношения белков указанных фракций особенно выражен в электрофоретическом спектре растворимых белков серого вещества головного мозга.

В таблицах 3 и 4 представлены данные автордиографических исследований включения  $S^{35}$ -метионина в электрофоретические фракции растворимых белков серого и белого вещества головного мозга контрольных и облученных животных.

Приведенный фактический материал свидетельствует о нарушении биохимических механизмов, участвующих в метаболизме белковых структур. Интенсивность включения  $S^{35}$ -метионина в электрофоретические фракции растворимых белков серого и белого вещества головного мозга находится в зависимости от течения и степени поражения животного ионизирующей радиацией; с углублением лучевой болезни проявляется ингибция биосинтеза белков, заключенных во фракциях, соответствующих по своей подвижности преальбуминам, альбуминам, и фракции, лежащей за  $\gamma$ -глобулинами сыворотки крови.

Ионизирующая радиация в применяемой нами дозе вызывает увеличение включения  $S^{35}$ -метионина в суммарные белки, заключенные в электрофоретических фракциях, которые по своей электрофоретической подвижности соответствуют  $\gamma$ -глобулинам сыворотки крови. Этот факт, очевидно, связан с тем, что при лучевой болезни организм интенсивно синтезирует те белки, функция которых определена выработкой антител, благодаря чему организм может дольше переносить лучевую болезнь.

Для более глубокого изучения влияния ионизирующей радиации на биосинтез растворимых белков тканей головного мозга, исходя из данных процентного соотношения электрофоретических фракций растворимых белков серого и белого вещества головного мозга и процента включения в них радиоактивной метки и активности 10 мг растворимых тканевых белков, мы определяли радиоактивность электрофоретических фракций растворимых белков в пересчете на 10 мг сухого веса белка фракции (таблицы 5 и 6).



Таблица 5

Радиоактивность электрофоретических фракций растворимых белков серого вещества головного мозга при рентгеновском облучении в дозе 1000 р (в имп/мин на 10 мг; средние данные)

№ фракции	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракция сывороточных белков	Контроль	Дни после облучения							
			1-й	3-й	6-й	9-й	12-й	15-й	18-й	21-й
1.	Преальбумины	506	510	359	842	482	551	202	971	322
2.	Альбумины	464	338	456	951	479	587	290	1306	406
3.	Неидентифици- ров.	278	382	649	1091	442	635	199	918	301
4.	$\alpha_1$ -глобулины	364	297	518	940	370	508	180	1000	322
	$\alpha'_1$ -глобулины	—	298	396	826	—	—	—	1137	286
5.	$\alpha_2$ -глобулины	292	207	330	837	331	481	150	1287	181
6.	$\alpha'_2$ -глобулины	361	209	280	774	225	—	234	1113	202
	$\alpha''_2$ -глобулины	—	—	—	855	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	317	—	—	688	235	450	196	1377	213
8.	$\alpha'_3$ -глобулины	341	254	250	—	304	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	321	210	208	1041	300	578	170	1000	174
10.	$\beta_2$ -глобулины	337	264	310	778	290	589	160	901	161
	$\beta'_2$ -глобулины	—	214	362	679	—	522	—	—	—
11.	неидентифи- цированы	248	373	475	602	212	464	137	786	193
12.		262	423	715	589	235	515	154	817	135
		—	448	—	—	—	—	206	—	167
	$\gamma_0$	—	—	1078	605	—	—	—	972	—
13.	$\gamma_1$	201	309	538	572	247	494	136	506	125
	$\gamma'_1$	—	—	443	592	—	—	—	780	—
14.	$\gamma_2$	286	236	942	637	434	515	195	644	137
	$\gamma'_2$	—	—	—	—	—	612	—	—	—
15.	$\gamma_3$	175	297	721	592	292	355	121	377	53
16.	За $\gamma$ -глобулинами	181	425	1736	864	195	722	130	735	131
	Общий растворимый белок	324	290	382	771	310	522	180	1040	204

Данные радиоактивности электрофоретических фракций растворимых белков в пересчете на 10 мг сухого белка серого (табл. 5) и белого (табл. 6) вещества головного мозга указывают на различную интенсивность процессов ингибиции биосинтеза белков как в отдельных белковых фракциях, так и в смеси белков серого и белого вещества головного мозга при поражении организма ионизирующей радиацией.

В сером веществе головного мозга интенсивность включения  $S^{35}$ -метионина в белковые фракции, имеющие адекватную подвижность с преальбуминами и альбуминами, а также в 3-ю фракцию носит волнообразный характер, отображая определен-

Таблица 6

Радиоактивность электрофоретических фракций растворимых белков белого вещества головного мозга при рентгеновском облучении в дозе 1000 р (в имп/мин на 10 мг; средние данные)

№ фракции	Соответствующая по электрофоретической подвижности фракция сывороточных белков	Контроль	Дни после облучения							
			1-й	3-й	6-й	9-й	12-й	15-й	18-й	21-й
1.	Преальбумины	1020	565	581	841	1228	1274	390	510	952
2.	Альбумины	1082	667	823	1311	2048	1394	535	683	1130
3.	Неидентифици- ров.	885	659	935	980	1386	1230	433	490	692
4.	$\alpha_1$ -глобулины	772	315	350	944	899	981	344	401	524
	$\alpha'_1$ -глобулины	—	378	330	912	—	—	—	540	—
5.	$\alpha_2$ -глобулины	822	316	389	583	1053	918	389	487	469
6.	$\alpha'_2$ -глобулины	710	304	237	555	828	—	293	697	455
	$\alpha''_2$ -глобулины	—	—	—	485	—	—	—	—	—
7.	$\alpha_3$ -глобулины	621	262	252	679	798	628	413	635	584
8.	$\alpha'_3$ -глобулины	820	—	—	—	931	—	—	—	—
9.	$\beta_1$ -глобулины	808	403	388	704	846	842	411	459	435
10.	$\beta_2$ -глобулины	556	276	376	622	1189	911	263	311	426
	$\beta'_2$ -глобулины	—	340	382	485	—	837	—	—	—
11.	неидентифи- цированы	532	421	687	406	1008	765	287	299	422
12.		809	586	867	494	782	537	459	259	519
		—	657	—	—	—	—	331	—	584
	$\gamma_0$	—	—	1622	650	—	—	—	519	—
13.	$\gamma_1$	390	289	766	557	998	682	199	251	326
14.	$\gamma_2$	602	457	601	791	1669	848	343	401	539
	$\gamma'_2$	—	—	—	—	—	1148	—	280	—
15.	$\gamma_3$	194	491	980	594	832	1594	142	178	136
	$\gamma'_3$	—	—	1231	—	—	—	—	—	—
16.	За $\gamma$ -глобулинами	431	1297	2331	1144	377	2565	199	240	299
	Общий растворимый белок	721	405	492	670	1000	900	354	503	517

ную фазу лучевой болезни. В этих фракциях ярко проявляется ингибция биосинтеза белка на 3-й, 9-й и 15-й дни после облучения.

В белом веществе головного мозга интенсивность включения  $S^{35}$ -метионина в белковые фракции растворимых белков, по сравнению с серым веществом, более высокая и достигает своего максимума на 9-й день течения лучевой болезни. В белковых фракциях белого вещества головного мозга отмечена резкая ингибция биосинтеза растворимых белков в первые дни течения лучевой болезни и усилением его на 9-й и 12-й дни после облучения.

Установленные нами закономерности изменений в белковом

спектре растворимых белков серого и белого вещества головного мозга говорят о значительном нарушении физико-химических свойств и биосинтеза отдельных электрофоретических фракций. По-видимому, механизм этих нарушений лежит в основе биологической интегральной системы, контролирующей биосинтез и метаболические процессы изучаемых белков.

Различная интенсивность включения  $S^{35}$ -метионина в растворимые белки серого и белого вещества головного мозга в контроле и при течении лучевой болезни позволяет считать, что интенсивность синтеза этих белков, по-видимому, обуславливается неодинаковой функциональной активностью самих нервных клеток и других структурных образований нервной ткани.

Не исключена возможность, что различная интенсивность биосинтеза отдельных фракций растворимых белков серого и белого вещества головного мозга связана с различной функцией каждой из них.

Этот принципиальный тезис является правдоподобным, если учесть, что поражение ЦНС при воздействии ионизирующей радиации происходит квантами, ингибируя одну за другой биохимические системы.

Допустимо также, что неадекватность биосинтеза белковых фракций на протяжении течения лучевой болезни связана с компенсаторными функциями в нервной системе.

### Выводы

1. Растворимые белки серого и белого вещества головного мозга животных разделяются на 16 электрофоретических фракций.

2. Ионизирующее излучение в дозе 1000 р вызывает значительные качественные и количественные изменения в электрофоретическом спектре растворимых белков серого и белого вещества головного мозга.

3. Установлено, что наиболее глубокие нарушения биосинтеза отдельных фракций растворимых белков серого вещества головного мозга находятся в прямой зависимости от течения и степени поражения животного лучевой болезнью. В динамике эти изменения носят волнообразный характер.

4. Биосинтез отдельных электрофоретических фракций растворимых белков белого вещества головного мозга сильно нарушен в начальный период лучевой болезни. На 9-й и 12-й дни после облучения во фракциях этих белков происходит усиленный биосинтез белков.

5. Растворимые белки серого и белого вещества головного мозга неодинаково включают радиоактивный метионин, что, по-видимому, связано с неодинаковым синтезом содержащих серу



белков. Допустимо, что эти различия при течении лучевой болезни связаны с компенсаторными функциями в нервной системе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Палладин А. В., Вопросы биохимии нервной системы, Киев, 15, 1965.
2. Палладин А. В., Вертаймер Н., ДАН СССР, 102, 309, 1955.
3. Минаев П. Ф., Влияние ионизирующих излучений на центральную нервную систему. Изд-во АН СССР, М., 1962.
4. Кузин А. М., Радиационная биохимия. Изд-во АН СССР, 1962.
5. Погодаев К. И., Осипова М. С., Кунеева З. И., Труды Ин-та высшей нервной деятельности. М., 4, 236—243, 1960.
6. Грачева Н. Д., Состояние некоторых отделов нервной системы при общем облучении ионизирующей радиации, Канд. дисс., Л., 1959.
7. Сухомлинов Б. Ф., Яковенко А. Н., Едкина В. Д., Материалы научной конференции по патологической физиологии с-х животных, М., 85, 1962.
8. Сухомлинов Б. Ф., Шевчук Я. Г. и др., Тезисы докладов первого Всесоюзного биохимического съезда. Изд-во АН СССР, М.—Л., 3, 188, 1964.
9. Сухомлинов Б. Ф., Чайка Я. П., Дацкив М. З., Великий, Тезисы докладов 1-го Украинского биохимического съезда, 374, 1965.
10. Сухомлинов Б. Ф., Дацкив М. З., Чайка Я. П., Великий Н. Н., Капис М. В., Шевчук Я. Г., Тезисы докладов республиканской конференции «Механизмы биологического действия ионизирующих излучений», 157, 1965.
11. Сухомлинов Б. Ф., Шевчук Я. Г., Тезисы докладов четвертой Всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, 100, 1966.
12. Шевчук Я. Г., Тезисы докладов XI научной конференции Львовского государственного университета им. Ив. Франко, 20, 1966.
13. Капланский С. Я., Кузовлева О. Б., Успенская В. Д., Биохимия, 21, 469, 1956.
14. Илков А., Николов Т., Вопр. мед. химии, 5, 388, 1959.
15. Чаговец Р. В., Душейко А. А., Укр. биохим. ж., 33, 1961, 676.
16. Dobryszcka W., Polski tygodnik lekarski, 3, 81, 1960.
17. Cohn P., Gaitonde M., Richter D., J. Physiol., 126, 7, 1954.

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие . . . . .	3
-----------------------	---

### Пленарные доклады

Палладин А. В. Биохимия головного мозга и психотропные вещества . . . . .	9
Кометиани П. А. О биохимических основах памяти . . . . .	22

### Азотистый обмен в нервной системе

Бунятян Г. Х., Мовсесян С. Г. Деаминирование никотинамид-адениндинуклеотидов в мозговой ткани и их роль в образовании свободного аммиака . . . . .	49
Тяхепыльд Л. Я. О роли обратимого амидирования белков в обмене и функциях мозга . . . . .	61
Владимирова Е. А. О взаимосвязи метаболизма аммиака и обратимого дезамидирования белков головного мозга как части биохимического компонента механизма саморегуляции структуры и функции нервной системы . . . . .	73
Чикваидзе В. Н., Шамкулашвили Г. Г. Об использовании $\gamma$ -аминомасляной и аспарагиновой кислот как энергетического материала в головном мозгу . . . . .	86
Промыслов М. Ш., Андреева Т. В. Глутамин, глутаминовая и $\gamma$ -аминомасляная кислоты глиальных образований мозга . . . . .	94
Гордиенко Э. А. К вопросу об обмене азотистых метаболитов мозга белых крыс в онтогенезе . . . . .	99
Певзнер Л. З. Метаболизм нуклеиновых кислот и белка в нейронах и нейроглии при различных функциональных состояниях нервной системы . . . . .	109
Бунятян Г. Х., Казарян Б. А., Гулян Э. А. О проникновении $\gamma$ -аминомасляной кислоты через гемато-энцефалический барьер и ее роль в обмене некоторых аминокислот мозга . . . . .	122
Гершеневич З. С., Кричевская А. А., Агафонова И. М., Готлобер И. В., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Щербина Л. А. Мочевина в функциональной биохимии мозга . . . . .	131
Мережинский М. Ф., Никитина С. М. Инсулиновая гипогликемия и содержание аммиака в мозгу . . . . .	144
Броновицкая З. Г., Погорелова Т. Н., Щербакова Г. В. Низкомолекулярные азотсодержащие соединения головного мозга при гипероксии . . . . .	149
Тяхепыльд А. К. О динамике обмена аммиака, глутамина и амидных групп белков мозга под действием АКТГ и кортизона . . . . .	161
Козлов Н. Б., Розанова Е. С., Стунжас Н. М., Шмаков Е. А. О некоторых биохимических сдвигах в мозговой ткани при перегревании . . . . .	169

Турова Н. Ф., Погодаев К. И. О нарушении ряда метаболических процессов головного мозга при экспериментальном атеросклерозе и утомлении . . . . .	176
Энно Д. А. Обмен аммиака, степень амидирования белков и активность некоторых ферментов в головном мозгу под действием аммиака, тиамин и пиридоксина . . . . .	186
Доведова Е. Л. Об особенностях окисления некоторых субстратов в митохондриях различных отделов мозга . . . . .	193

### Белки, нуклеиновые кислоты и ферменты нервной ткани

Шабадаш А. Л. Некоторые гисто-химические критерии участия различных рибонуклеопротеидных структур нервной клетки в следовых процессах (памяти) . . . . .	203
Белик Я. В., Терлецкая Я. Т., Смерчинская Л. С. Ферментативная и метаболическая характеристики субмитохондриальных фракций ткани головного мозга . . . . .	214
Клейн Е. Э., Курцхалия Э. Г. О разделении белков головного мозга. Роль разных фракций в аммиакообразовании . . . . .	225
Кудинов С. А., Полякова Н. М. Исследование одного из электрофоретически положительных белков головного мозга . . . . .	239
Галоян А. А., Абелян Ж. Г. Водорастворимые белки нейрогипофиза и их функциональное значение . . . . .	251
Полякова Н. М., Малышева М. К. Изучение АМФ-деаминазы головного мозга . . . . .	259
Рожманова О. М., Кирсенко О. В. Биохимические и гистохимические исследования АТФазной активности регенерирующих и дегенерирующих нервов . . . . .	267
Розенгарт В. И., Шмелева В. Г., Щербак И. Г. Изучение кинетики угнетения холинэстеразы мозга <i>in vitro</i> при введении антихолинэстеразных веществ . . . . .	278
Панюков А. Н. Место синтеза холинэстераз, их соотношения в гидролизе специфических субстратов и возможная роль в мозгу животных . . . . .	285
Пигарева З. Д., Камышева А. С. Некоторые закономерности окислительных процессов митохондрий мозга в постнатальном онтогенезе . . . . .	299
Герштейн Л. М., Гаевская М. С., Носова Е. А., Слѣз Л. М. Влияние глубокой гипоксии на активность некоторых ферментов нервной ткани . . . . .	314
Нечаева Г. А. О рибонуклеазной активности ткани головного мозга . . . . .	323
Левченко Л. И. Нуклеотидный состав нуклеиновых кислот мозга и мозговых опухолей человека . . . . .	333
Броун Р. Г., Гончарова В. П., Юань Хоу-Цзи. К вопросу о гетерогенности препаратов нуклеиновых кислот, полученных из ткани мозга . . . . .	339

### Липиды мозга и их обмен

Прохорова М. И., Липская А. А., Соколова Г. П., Туманова С. Ю., Флеров М. А. Изучение отдельных фракций липидов головного мозга методом тонкослойной хроматографии . . . . .	349
Карагезян К. Г. Качественная и количественная характеристика фосфолипидов цельной крови и изменения артерио-венозной разницы в их содержании, а также в скорости мозгового кровообращения у собак под действием электрокожного раздражения . . . . .	365
Манукян К. Г. О липидном компоненте протеолипидов мозга . . . . .	375



Иванова Т. Н., Рубель Л. Н., Семенова Н. А. О различных уровнях скорости обмена фосфора некоторых фосфолипидов ткани мозга крыс . . . . .	386
Дворкин В. Я. Динамика восстановления интенсивности обмена отдельных фракций фосфолипидов головного мозга крыс в постгипоксическом периоде . . . . .	396
Улыбина И. Н. Липидные гранулы цитоплазмы нейронов в норме и при различных воздействиях . . . . .	407
Соколова Г. Н., Золотова Л. А. Изучение жирных кислот некоторых фракций липидов головного мозга . . . . .	415
Крепс Е. М., Красильникова В. И., Патрикеева М. В., Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Ченыкаева Е. Ю. Фосфолипиды субклеточных фракций мозга представителей разных классов позвоночных . . . . .	425
Эпштейн Я. А., Максимова А. М., Аюбов М. К. Ганглиозиды головного мозга . . . . .	435
Смирнов А. А., Чирковская Е. В. Фосфатидная кислота в развивающемся мозгу . . . . .	445
Правдина Н. И., Помазанская Л. Ф., Забелинский С. А. Жирно-кислотный состав некоторых фосфолипидов субклеточных фракций мозга кроликов . . . . .	450
Мхитарян В. Г., Бадалян Г. Е. Сдвиги в содержании гликолипидов, фосфолипидов и их фракций в мозгу белых крыс при хроническом хлоропропаном отравлении и рентгенооблучении . . . . .	457
Романова Л. С., Туманова С. Ю. Характеристика ганглиозидов и цереброзидов головного мозга растущих крыс в норме и при гипоксии . . . . .	468

#### Углеводный обмен и энергетика мозга

Тупикова З. Н., Вилкова В. А., Корвацкая А. М. Особенности синтеза гликогена мозга из различных гликогенообразователей . . . . .	475
Яковлева М. Н., Иваненко Е. Ф. Интенсивность обмена глюкозы и гликогена мозга в разные сроки экспозиции с I-C <sup>14</sup> -глицином и при воздействии гидрокортизона . . . . .	485
Оганесян А. С., Демирчян А. А. Система аденозинтрифосфатаденозинтрифосфатазы и транспорт глюкозы в мозговую ткань . . . . .	496
Сибуль И. К. Об урегулировании сопряженного с дыханием фосфорилирования в нервной ткани экстрактом эстонской морской лечебной грязи . . . . .	509
Минаев П. Ф., Логвинова О. Ф. Изменения окислительных процессов в центральной нервной системе под влиянием различных физических факторов . . . . .	515
Ещенко Н. Д., Крестникова Л. М., Путилина Ф. Е. Интенсивность обмена некоторых компонентов цикла Кребса при гипоксии, действии 2,4-динитрофенола, аминазина и хлоралгидрата . . . . .	528

#### Медиаторы и биогенные амины в мозгу и их обмен

Утевский А. М. О биохимических факторах взаимосвязи в нейроэндокринной системе . . . . .	537
Дёмин Н. Н. О некоторых взаимоотношениях между ацетилхолином и другими низкомолекулярными биоактивными веществами в нервной ткани . . . . .	544
Вержбинская П. А., Лейбсон Н. Л., Тонкоглас В. П. Гетерогенность биохимической структуры системы ацетилхолина мозга в ряду позвоночных животных . . . . .	553

Курский М. Д., Федоров А. Н., Зряков О. Н. Влияние серотонина на окислительное фосфорилирование и содержание нуклеотидов в ткани головного мозга и печени кроликов . . . . .	573
Сытинский И. А., Сазонец Г. И., Шан Кэ-Цзинь. Система $\gamma$ -аминомасляной кислоты в головном мозгу крыс при общем рентгеновском облучении . . . . .	581
Барц М. П. Некоторые вопросы механизма химической медиации симпатических нервных импульсов . . . . .	585

#### Действие психотропных средств на обмен веществ в нервной системе

Балуев С. И. Биохимические и функциональные изменения в головном мозгу при рефлекторном и центральном действии амизила и центрофеноксина . . . . .	595
Бару А. М. Содержание в головном мозгу, сердце и надпочечниках катехоламинов и их экскреция при хроническом введении резерпина и имипрамина . . . . .	605
Тийгмияэ Э. К. О влиянии хронического введения имипрамина на азотистый обмен в головном мозгу крыс . . . . .	615
Маслова М. Н. Биохимические и функциональные изменения в мозгу животных при возбуждении . . . . .	625
Ильющенок Т. Ю., Шадурский К. С. Изыскание средств, регулирующих содержание серотонина в центральной нервной системе . . . . .	634
Кулинский В. И. Динамика содержания норадреналина в головном мозгу при некоторых воздействиях . . . . .	642
Есаян Н. А. Действие $\gamma$ -аминомасляной кислоты на уровень катехоламинов в мозгу . . . . .	650
Голубков О. З. Динамика функционального состояния головного мозга и взаимоотношения некоторых нейромедиаторов в крови у больных эпилепсией . . . . .	659

#### Влияние различных факторов на обмен веществ в нервной системе

Хватова Е. Н., Городисская Г. Я., Швеи Н. Функциональная активность митохондрий мозга при охлаждении организма в период восстановления температуры тела . . . . .	667
Бармина О. Н., Андреева Н. П., Смирнова О. А., Загоскин П. П., Корытникова С. Н., Чебыкина Е. В. Влияние травматического шока на некоторые показатели веществ головного мозга . . . . .	676
Гуныко М. В., Мищенко Л. И., Френкель С. Р. Некоторые общие черты и особенности нарушений обмена мозга при действии на организм вредных физических и химических факторов среды . . . . .	685
Митюшов М. И., Шалапина В. Г., Ракицкая В. В. Действие кортикостероидов на содержание норадреналина и активность холинэстеразы в мозгу крыс при стрессе . . . . .	695
Черкасова Л. С., Кукушкина В. А., Миронова Т. М., Пикулев А. Т., Тайц М. Ю., Фомиченко К. В., Кукулянская М. Ф., Фомиченко-Рембергер В. Г., Мохова С. И., Садукевич В. Б. Действие нейтронов промежуточных энергий на обменные процессы в центральной нервной системе . . . . .	699
Рева А. Д., Кухаренко Р. И., Руденко Л. П., Купрюнин В. Д. О влиянии ионизирующей радиации на биохимические процессы в спинном мозге . . . . .	710
Сухоминов Б. Ф., Шевчук Я. Г. Влияние ионизирующей радиации на биосинтез растворимых белков головного мозга . . . . .	722